

UNIVERSITA' DI PISA



Dipartimento di Farmacia

Corso di laurea specialistica in Farmacia

Tesi di laurea

**INIBITORI DIRETTI DELLA TROMBINA E DEL
FATTORE Xa COME NUOVA FRONTIERA NELLA
TERAPIA DI PATOLOGIE TROMBOEMBOLICHE**

Relatore

Dott.ssa Francesca Simorini

Correlatore

Prof.ssa Annalina Lapucci

Candidata

Kelly Sichi

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Indice

Introduzione	4
Capitolo 1	
1.1. Meccanismo della coagulazione del sangue	5
1.1.1. Analisi del processo della coagulazione	6
• La via estrinseca	7
• La via intrinseca	8
1.1.2. Analisi dei fattori della cascata coagulativa	9
1.1.3. Retrazione del coagulo	13
1.1.4. Dissoluzione del coagulo	14
1.2. Meccanismi fisiologici del controllo della coagulazione	14
1.2.1. Anticoagulanti intravasali	14
1.2.2. Azione antitrombinica della fibrina e dell'antitrombina III	15
1.2.3. Eparina	15
1.2.4. Plasmina	16
1.2.5. Patologie dovute ad alterazioni coagulativa	17
1.3. Farmaci utilizzati nelle pratiche cliniche	18
1.3.1. Anticoagulanti orali	19
1.3.2. Anticoagulanti correlati all'eparina	20
1.3.3. Inibitori diretti della trombina (DTI, <i>Direct Thrombin Inhibitors</i>)	22

1.3.4. Antiaggreganti piastrinici	23
• Inibitori delle COX-1	23
• Inibitori delle fosfodiesterasi	24
• Antagonisti dei recettori piastrinici purinergici P2Y	25
• Antagonisti del recettore GPIIb/IIIa	26
1.3.5. Agenti trombolitici	27
• Agenti trombolitici di prima generazione	27
• Agenti trombolitici di seconda generazione	28
• Agenti trombolitici di terza generazione	28

Capitolo 2

2.1. Test per la sperimentazione dei farmaci	30
2.2. Le serina proteasi	31
2.2.1. Meccanismo catalitico delle proteasi a serina	32
2.2.2. Struttura delle proteasi a serina	35
2.2.3. Nomenclatura dei siti di legame delle serina proteasi	37
2.3. Struttura delle proteasi fIIa	38
2.4. Struttura delle proteasi fXa	38

Capitolo 3

3.1. Inibitori del fattore II a	43
3.2. Scoperta del Dabigatran	46
3.2.1. Sintesi Dabigatran	49
3.3. Dabigatran etexilato	52
3.4. Dabigatran e Dabigatran etil estere come inibitori di ribosildiidronicotinammide deidrogenasi (NQO2)	54

Capitolo4

4.1. Inibitori del fattore Xa	57
4.2. Scoperta del rivaroxaban	60
4.3. Scoperta dell'Apixaban	62
4.3.1. Interazione dell'Apixaban con il fXa	63

Capitolo5

5.1. Effetti della sostituzione di gruppi P1 arginino-mimetici con arilalogeni	66
5.2. Preferenza per legami con gruppi caricati positivamente nella tasca S4 del fXa	70
5.3. Progettazione structure-based degli inibitori “duali” di fIIa e fXa	73

Conclusioni

76

Bibliografia

80

Introduzione

La ricerca di nuovi farmaci per il trattamento di eventi tromboembolici, come trombosi venose, embolie polmonari e ictus, ha subito un'evoluzione quando sono state determinate nel 1989 e 1993 le strutture tridimensionali di due fattori importanti della cascata coagulativa.

La progettazione basata sulla struttura degli inibitori della trombina (fattore IIa) e fattore Xa, ha portato alla scoperta di composti potenti, selettivi, efficaci, attivi per via orale e sicuri, che hanno avuto successo negli studi clinici.

Nel 2008, l'inibitore diretto della trombina Dabigatran etexilato, sviluppato dalla Boehringer-Ingelheim, diventò la prima nuova entità molecolare ad entrare nel mercato dopo 50 anni.

Precedentemente a queste scoperte, infatti, per le terapie standard dei disordini tromboembolici venivano utilizzati gli antagonisti della vitamina K. Da questa scoperta in poi invece, hanno ottenuto l'autorizzazione all'immissione in commercio, o sono in fase avanzata di studi clinici, anche altri composti che vanno ad agire sul fattore Xa (Nar, 2012).

Capitolo 1

1.1. Meccanismo della coagulazione del sangue

La coagulazione è un importante meccanismo dell'emostasi, cioè della prevenzione della perdita di sangue, che dipende dall'equilibrio tra due gruppi di sostanze: i procoagulanti e gli anticoagulanti.

Nel torrente sanguigno predominano gli anticoagulanti, mentre i procoagulanti vengono reclutati a seguito di lesioni e in tal caso prevarranno sugli anticoagulanti, andando a formare il coagulo.

La formazione del coagulo si divide in tre fasi:

In risposta alla rottura di un vaso o all'alterazione del sangue si attiva la cascata coagulativa che ha come risultato la formazione del complesso "attivatore protrombinico".

L'attivatore protrombinico catalizza la conversione della protrombina in trombina;

La trombina agisce da enzima trasformando il fibrinogeno in filamenti di fibrina che avvolgono le piastrine, le cellule ematiche e il plasma, portando alla formazione del coagulo. Per tutto questo è necessaria la presenza di Ca^{++} .

Il risultato del processo descritto è quindi il coagulo di sangue, costituito da una rete di filamenti di fibrina orientati in tutte le direzioni che intrappolano cellule ematiche, piastrine e plasma. I filamenti di fibrina aderiscono anche alle superfici danneggiate dei vasi sanguigni.

1.1.1. Analisi del processo della coagulazione

La coagulazione avviene, quindi, successivamente ad un danneggiamento di un tessuto o di cellule sub-endoteliali di un vaso sanguigno: si ha un immediato riflesso vasocostrittore che riduce il flusso ematico e le piastrine cominciano ad accumularsi sulle cellule danneggiate.

Quest'ultime subiscono, quindi, un immediato e drastico cambiamento conformazionale: rigonfiano, si formano pseudopodi, le proteine contrattili si contraggono causando il rilascio di granuli contenenti numerose sostanze attive, diventano adesive così da attaccarsi al collagene dei tessuti e ad una proteina (fattore di Willebrand) che dal plasma si infila nei tessuti danneggiati.

Le piastrine secernono grandi quantità di ADP (adenosina difosfato) e i loro enzimi formano TXA₂ (trombossano).

ADP e TXA₂ vanno ad agire sulle piastrine vicine attivandole e l'adesività di quest'ultime determina la loro adesione alle piastrine originali attivate. Pertanto, la parete danneggiata determina l'attivazione successiva di un numero crescente di piastrine, che a loro volta fanno aggregare su di sé sempre più piastrine fino a formare un tappo piastrinico. Si parla così di "aggregazione piastrinica".

Ad eccezione del calcio e dei fosfolipidi piastrinici, i fattori della coagulazione sono di natura proteica; essi sono dei proenzimi e come tali sono inattivi fino a quando non sono attivati ad enzimi proteasici per scissione di uno o due legami peptidici.

Gli enzimi attivi a loro volta attivano un altro proenzima, e così via, in un processo a cascata (figura 1.1). Il complesso attivatore delle protrombina è formato attraverso due vie, che interagiscono continuamente: una intrinseca (i cui fattori sono tutti presenti nel sangue) e una estrinseca che dipende dal rilascio di tromboplastina da parte delle cellule e dei tessuti lesi.

- ***La via estrinseca***

Viene attivata in seguito ad un trauma tissutale che fa liberare il fattore tissutale o tromboplastina tissutale, costituito soprattutto da fosfolipidi, derivanti dalle membrane dei tessuti, e da un complesso lipoproteico che ha funzione di enzima proteolitico. Questo si combina con il fattore VII e in presenza di ioni Ca^{++} va ad agire enzimaticamente sul fattore X per formare il fattore Xa (attivato).

Il fattore Xa si combina immediatamente con fosfolipidi tissutali che fanno parte del fattore tissutale o altri fosfolipidi liberati dalle piastrine, ed inoltre con il fattore V per formare il complesso "attivatore della protrombina", ovviamente in presenza di ioni Ca^{++} . In pochi secondi va così a scindere la protrombina in trombina ed il processo della coagulazione procede.

Successivamente l'attività della protrombina attiverà il fattore V, così il fattore attivato Va accelererà l'attività della protrombina stessa con un meccanismo a *feedback* positivo.

Il fattore Xa resta comunque la proteasi che determina l'effettiva scissione delle protrombina in trombina.

- ***La via intrinseca***

Alla base di questa via c'è il mantenimento dell'omeostasi. Un evento traumatico altera due importanti fattori della coagulazione presenti nel sangue: fattore XII e piastrine. Quando il fattore XII è alterato assume una nuova conformazione molecolare che lo converte in enzima proteolitico detto fattore XIIa. Simultaneamente il trauma sul sangue altera anche le piastrine le quali liberano fosfolipidi piastrinici che contengono una lipoproteina, ovvero il fattore piastrinico III, che svolge un ruolo anche in altre reazioni della coagulazione.

Il fattore XIIa agisce sul fattore XI attivandolo; la reazione è accelerata dalla precallieina e richiede chininogeno ad alto peso molecolare (*High Molecular Weight Kininogen*, HMWK). Il fattore XIa agisce enzimaticamente sul fattore IX, che è così attivato. Il fattore IXa, quindi, agendo di concerto con il fattore VIII, con i fosfolipidi piastrinici e il fattore III, che a sua volta è liberato dalle piastrine danneggiate, attiva il fattore X.

Il fattore Xa si combina con il fattore V e le piastrine o i fosfolipidi tissutali, per formare il complesso "attivatore protrombinico" che scinderà la protrombina in trombina mettendo in moto il processo finale della coagulazione.

La via intrinseca e la via estrinseca della coagulazione convergono entrambe nell'attivazione del fattore X a Xa. La differenza sostanziale tra la via intrinseca ed estrinseca è che quest'ultima ha carattere esplosivo e la velocità di formazione del coagulo, una volta attivata, è limitata solo dalla quantità del fattore tissutale liberato dai tessuti danneggiati e dalla concentrazione dei fattori X, VII e V (Guyton *et al.*, 2006).

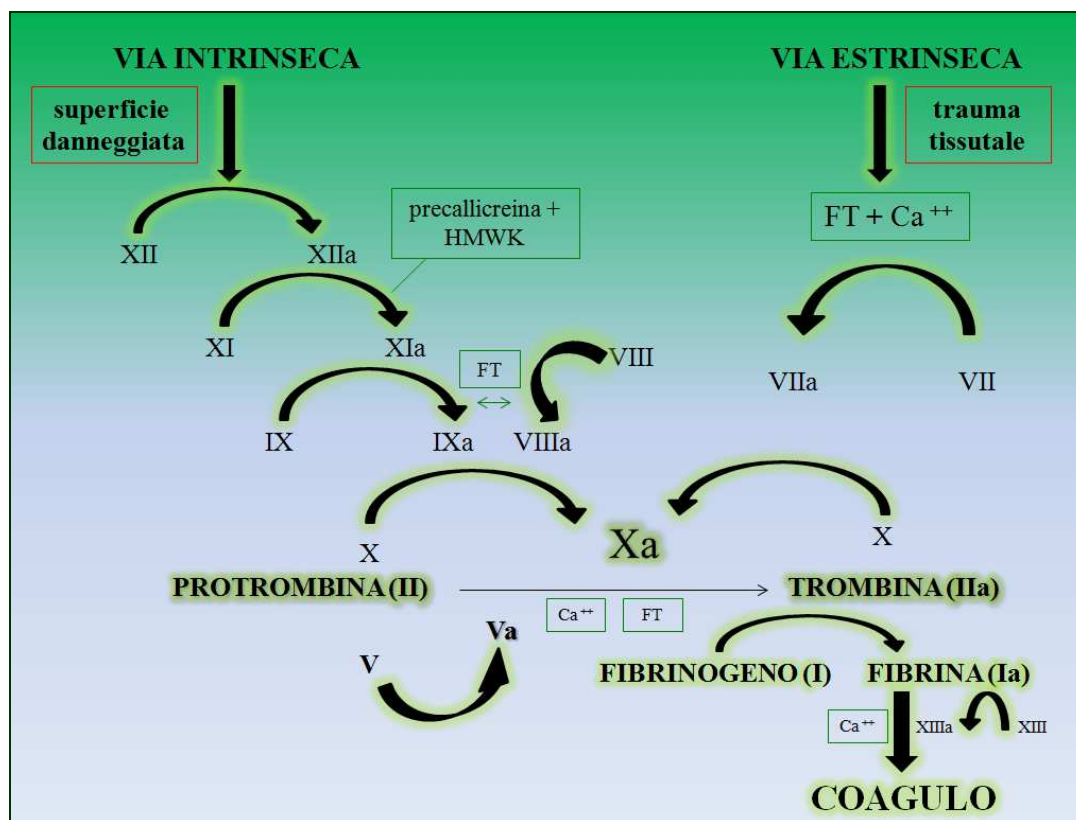


Figura 1.1: cascata coagulativa

1.1.2. Analisi dei fattori della cascata coagulativa

FATTORE I o FIBRINOGENO: proteina a sei catene; PM 340000; emivita plasmatica 72-96 h; è una glicoproteina prodotta dal fegato che si trova in circolo come molecola costituita da due emimolecole identiche. Il fibrinogeno, una volta attivato dalla protrombina mediante un'azione proteolitica, genera monomeri di fibrina.

FATTORE II o PROTROMBINA: proteina α -2-globulinica ad una catena; PM 70000; emivita plasmatica: 60h; è una glicoproteina sintetizzata a livello

epatico. E' un fattore vitamina K dipendente. Scissa in due parti dal fattore Xa in presenza del fattore Va e fosfolipidi, dà la trombina.

TROMBINA: glicoproteina a doppia catena che si origina per degradazione enzimatica della protrombina. A sua volta rimuove due coppie di peptidi dal fibrinogeno per dare la fibrina.

FATTORE III o FATTORE TISSUTALE (FT): (PM 45000) glicoproteina ad una catena, espressa sulla membrana plasmatica, presente in tutti i tessuti. Ha un ruolo di iniziatore fisiologico della cascata coagulativa del sistema estrinseco, con alta affinità per il fattore VII e forma un complesso che in presenza di Ca^{++} attiva fX e fIX. Non ha bisogno di attivazione ed è inibito da TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*).

FATTORE IV: Calcio (Ca^{++}).

FATTORE V: proteina globulinica ad una catena; PM 330000; emivita plasmatica 15h; sintesi epatica e piastrinica. Attivato dal fattore Xa o dalla trombina. Il fattore Va è un cofattore, non un enzima. Importante nell'attivazione della protrombina. E' inattivato dalla proteina C attiva.

FATTORE VI: non più considerato

FATTORE VII: proteina β -globulinica ad una catena; PM 55000; emivita plasmatica 5 h; fattore vitamina K dipendente, ha emivita plasmatica breve. Può essere attivato dalla via intrinseca (fXIa, fXa, fXIIa) e da frammenti

derivati dall'attivazione del fibrinogeno. Ma il fattore VII, per svolgere la sua attività procoagulante deve formare un complesso con il fattore tissutale (fIII o FT), Ca^{++} e fosfolipidi. Il tutto andrà ad attivare il fX.

FATTORE VIII: proteina α -2 o β -globulinica ad una catena a 6-10 subunità; PM 1-2000000; emivita plasmatica 10 h sintetizzato dal fegato. Essendo instabile, in circolo è legato al fattore *di von Willebrand* (vWF) che è una glicoproteina. Retroattivato dalla trombina e inattivato dalla proteina C, fVIII è un cofattore importante per fIXa, che in presenza di Ca^{++} e fosfolipidi attiva fX.

FATTORE IX: proteina β -globulinica ad una catena; PM 57000; emivita plasmatica 25 h; fattore K dipendente. Attivato sia dal fXIa che dal complesso fVIIa-FT. Attiva il fX in presenza di un complesso detto tromboplastina intrinseca formato dal Ca^{++} , fosfolipidi e fVIIa.

FATTORE X o FATTORE DI STUART: proteina α -globulinica a due catene; PM 59000; emivita plasmatica 40 h; fattore vitamina K dipendente. Proteina complessa, simile all'EGF (*Epidermal Growth Factor*), origina da un precursore a singola catena che poi è convertito nella forma matura a doppia catena, tenuta insieme da legami disolfuro. E' l'unico fattore della coagulazione presente in circolo come doppia catena con un PM di circa 59 kD. Le due catene sono: una leggera, contenente i residui di acido γ -carbossiglutammico (Gla) e due domini simili a EGF (*EGF-like domains*), domini che fanno sì che la sua attivazione induca riparazione tissutale; e una pesante, contenente il sito catalitico. Sul fX convergono le due vie,

l'intrinseca e l'estrinseca. La convergenza è importante perché consente la trasformazione della protrombina (in presenza di Ca^{++} e fosfolipidi) in qualunque modo la coagulazione sia stata attivata.

FATTORE XI: proteina β -2-globulinica a due catene; PM 124000; emivita plasmatica 45-65 h; glicoproteina di sintesi epatica presente nel plasma come proenzima legato non covalentemente all'HMWK. Attivato dal fXIIa ed insieme a questo ha anche un ruolo nella fibrinolisi, infatti dopo l'attivazione i due fattori agiscono sul plasminogeno trasformandolo in plasmina.

FATTORE XII: proteina a una catena; PM 80000; emivita plasmatica 60 h. Primo fattore che si attiva nella via intrinseca. E' una glicoproteina di sintesi epatica, presente in circolo come una singola catena. Può essere attivato dal contatto con superfici non idrorepellenti: connettivo, tessuto sottoendoteliale, ma anche enzimi proteolitici come callicreina (K), tripsina e plasmina.

FATTORE XIII o fattore stabilizzante la fibrina: proteina a quattro catene; PM 300000; emivita plasmatica 150 h. Fattore *cross-linking* dei dimeri di fibrina; in sua mancanza il coagulo avrà tendenza a distaccarsi causando sanguinamento tardivo. E' una proteina sintetizzata dal fegato presente nel plasma in forma tetramerica ed induce *cross-linking* di fibrina che, dopo l'azione della trombina, è in forma dimerica.

PRECALLICREINA: proteina γ -globulinica ad una catena; PM 80000; glicoproteina di sintesi epatica. Circola nel sangue associato al HMWK.

Convertita in callicreina dal fXIIa mediante taglio enzimatico, a sua volta attiva il fXII, il plasminogeno e l'HMWK.

FATTORE HMWK o CHININOGENO AD ALTO PESO MOLECOLARE: proteina α -globulinica ad una catena; PM 120000; emivita plasmatica 156h; è una glicoproteina a singola catena, presente nel plasma sotto forma di complessi bimolecolari con la precallicroina e il fXI. Possiede la proprietà di accelerare le reazioni di attivazione della fase di contatto.

PROTEINA C: nella forma matura è una glicoproteina a doppia catena, a sintesi epatica e vitamina K-dipendente. Insieme alla proteina S, svolge importanti ruoli nel controllare la cascata coagulativa, nel limitare la risposta all'infiammazione e nel contrastare l'apoptosi in risposta a citochine infiammatorie e ischemia (Castoldi *et al.*, 2007).

1.1.3. Retrazione del coagulo

Pochi minuti dopo la formazione del coagulo esso comincia a contrarsi ed a emettere gran parte del fluido in esso contenuto (20-60 min). Il liquido emesso è il siero, che differisce dal plasma perché non contiene fibrinogeno e buona parte dei fattori della coagulazione sono stati rimossi e per questo non coagula.

Le piastrine sono indispensabili per la retrazione del coagulo poiché attivano le proteine contrattili e rilasciano sostanze procoagulanti, come il fattore stabilizzante la fibrina (fXIII) che rafforza il reticolo.

1.1.4. Dissoluzione del coagulo

L'ultimo stadio della cascata della coagulazione è la dissoluzione del coagulo di fibrina da parte del sistema fibrinolitico, che agisce rimuovendo il coagulo senza danneggiare l'integrità vascolare. Il sistema fibrinolitico svolge la sua azione grazie ad una proteasi non specifica chiamata plasmina, sotto descritta, la cui funzione è quella di digerire la fibrina (Guyton *et al.*, 2006).

1.2. Meccanismi fisiologici del controllo della coagulazione

1.2.1. Anticoagulanti intravasali

Per prevenire la coagulazione del sistema vascolare normale è necessario avere:

opportuna levigatezza della superficie cellulare endoteliale; lo strato glicocalice sull'endotelio: un mucopolisaccaride che viene adsorbito sulla superficie cellulare che respinge i fattori della coagulazione e le piastrine, prevenendo così l'attivazione della coagulazione; la trombomodulina, una proteina che si combina alla trombina legata alla membrana dell'endotelio. Il legame trombomodulina-trombina rallenta il processo di coagulazione e determina l'attivazione della proteina C (proteina plasmatica) che agisce come anticoagulante inibendo i fattori V e VIII attivati;

Quando la parete endoteliale danneggiata perde la levigatezza, lo strato glicocalice e la trombomodulina si determina l'attivazione del fattore XII e

delle piastrine che comporta, a sua volta, l'attivazione del meccanismo intrinseco della cascata coagulativa.

1.2.2. Azione antitrombinica della fibrina e dell'antitrombina III

Tra i più importanti fattori anticoagulanti presenti nel sangue stesso, quelli che rimuovono la trombina sono: i filamenti di fibrina, che vengono formati durante il processo della coagulazione, e l'antitrombina III (α -globulina) o cofattore antitrombina-eparina.

Quando si forma un coagulo, circa l'85-90% della trombina prodotta dalla protrombina si adsorbe ai filamenti di fibrina non appena si formano. Questo aiuta a prevenire la diffusione della trombina nel resto del sangue e impedisce, quindi, un'eccessiva espansione del coagulo. La trombina non adsorbita dai filamenti di fibrina si combina rapidamente con l'antitrombina III, che blocca l'effetto della trombina sul fibrinogeno e inattiva la trombina stessa per i 12-20 minuti successivi.

1.2.3. Eparina

E' un potente anticoagulante e la sua concentrazione nel sangue è normalmente bassa; soltanto in particolari condizioni fisiologiche svolge una significativa azione anticoagulante.

Usata nella pratica medica a concentrazioni molto maggiori, come farmaco per prevenire la coagulazione intravasale.

Di per sé l'eparina ha poche proprietà anticoagulanti, ma quando si combina con l'antitrombina III l'efficacia aumenta da 100 fino a 1000 volte.

In presenza di un eccesso di eparina, la rimozione della trombina liberata dal circolo sanguigno da parte dell'antitrombina III è pressoché istantanea.

Il complesso eparina-antitrombina III oltre alla trombina elimina numerosi fattori della coagulazione attivati (XII, XI, X e IX), aumentando l'efficacia dell'effetto anticoagulante. Una sufficiente quantità di eparina previene, quindi, la crescita di coaguli.

1.2.4. Plasmina

La plasmina (o fibrinoplasmina) è un enzima proteolitico che genera dall'attivazione del plasminogeno (o profibrinolisinina), che a sua volta è un proenzima inattivo che è idrolizzato da un gruppo di proteasi a serina simili alla tripsina, la più importante delle quali è l'attivatore tissutale del plasminogeno (*tissue-type Plasminogen Activator*, tPA). Questo è rilasciato dall'endotelio vascolare leso e, pochi giorni dopo il blocco dell'emorragia da parte del coagulo, trasforma il plasminogeno in plasmina, la quale rimuove a sua volta ciò che resta di inutile del coagulo. La plasmina manca di specificità di substrato, infatti essa degrada, oltre ai filamenti di fibrina, diverse altre proteine coagulanti quali: fibrinogeno, fattore V, VIII, XII e protrombina. Quando si forma può causare lisi di un coagulo distruggendo molti dei fattori della coagulazione, così talvolta si può avere una ridotta coagulazione del sangue.

1.2.5. Patologie dovute ad alterazioni coagulative

- ***Emorragie***

Gravi emorragie possono dipendere da carenze di uno qualsiasi dei fattori della coagulazione sanguigna. I tre tipi particolari di predisposizione al sanguinamento sono: la carenza di vitamina K, l'emofilia e la trombocitopenia (deficienza piastrinica).

La vitamina K è indispensabile per la formazione nel fegato di cinque fattori della coagulazione: fattore VII, IX, X, proteina C e protrombina. L'assenza di vitamina K comporta quindi l'assenza di questi fattori e ne consegue una predisposizione all'emorragia. La vitamina K viene sintetizzata nella flora intestinale. Malattie epatiche causano quindi un'insufficiente produzione di protrombina e altri fattori per scarso assorbimento di vitamina K o per malattie delle cellule epatiche.

L'emofilia si verifica per anomalie o per carenza del fattore VIII (emofilia A) o carenza del fattore IX, e riguarda soltanto il genere maschile. Altra malattia emorragica è la malattia di Von Willebrand dovuta ad una carenza della subunità più grossa del fattore VIII, risolvibile con iniezioni di fattore VIII.

La trombocitopenia è, invece, la presenza di un numero basso di piastrine nel sangue che causa la presenza di macchie cutanee porpuree (porpora trombocitopenica).

- ***Trombi ed emboli***

Il trombo è un coagulo anomalo che si forma all'interno di un vaso. Non appena il coagulo si è formato, il sangue continua a fluire vicino al coagulo e può avvenire il distaccamento dal punto di ancoraggio e far sì che scorra con il sangue. I coaguli liberi nel sangue sono gli emboli, questi possono andare ad occludere arterie o arteriole del cervello, reni, polmoni, ecc. .

Il fenomeno è causato dalla rugosità della superficie vasale che può verificarsi per arteriosclerosi, infezioni e traumi, determinando l'attivazione del processo di coagulazione; può anche verificarsi per scorrimento lento del sangue attraverso i vasi portando a coagulazione.

Un metodo di intervento per questi casi è l'utilizzo del t-PA, a volte infuso con catetere direttamente nell'area trombotica.

1.3. Farmaci utilizzati nelle pratiche cliniche

In alcune condizioni tromboemboliche è opportuno rallentare il processo della coagulazione con l'ausilio di opportuni farmaci. Tra gli strumenti che ci permettono di controllare il corretto funzionamento del processo coagulativo, è possibile utilizzare il test di coagulazione dal quale ricaveremo il tempo necessario perché avvenga la coagulazione, ovvero il tempo di protrombina (PT).

- **Test di coagulazione**

Il sangue prelevato da un paziente è immediatamente trattato con ossalati, così che nessuna molecola di protrombina venga convertita in trombina. Successivamente, viene aggiunto al sangue trattato con ossalato un eccesso di ioni Calcio (Ca^{++}) e di fattore tissutale (FT). L'eccesso di calcio annulla l'effetto dell'ossalato ed il fattore tissutale attiva la conversione della protrombina in trombina tramite la via estrinseca della coagulazione. Il tempo di protrombina (PT) sarà tanto più breve quanto più elevata è la concentrazione di protrombina. Normalmente il PT è di circa 12 secondi.

1.3.1. Anticoagulanti orali

Cumarine: sono antagonisti della vitamina K, producono i loro effetti interferendo con l'interconversione ciclica della vitamina K in vitamina 2,3-epossido. Le cumarine, come ad esempio il warfarin (figura 1.2), hanno un effetto inibitorio sulla formazione epatica di protrombina, fattore VII e X. Svolgono l'effetto anticoagulante andando a competere con la vitamina K per i siti reattivi nei processi enzimatici che portano alla formazione di questi fattori della coagulazione, bloccando così l'attività della vitamina K stessa.

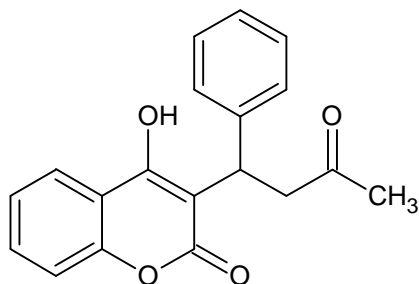


Figura 1.2: struttura del warfarin

Indandioni: i derivati dell'1,3-indandione, come il fenindione e l'anisindione, sono anticoagulanti orali che agiscono con un meccanismo di azione simile alle cumarine, ma sono usati raramente a causa della loro rilevante tossicità renale ed epatica. I pazienti allergici al warfarin non possono essere trattati con questi farmaci poiché c'è sensibilità crociata tra le due classi di farmaci, dovuta alle loro similarità strutturali.

1.3.2. Anticoagulanti correlati all'eparina

L'eparina viene estratta da tessuti di diverse specie animali e preparata in forma pura (figura 1.3). Iniettata in quantità basse, varia il tempo di coagulazione istantaneamente così da prevenire o rallentare l'ulteriore sviluppo di una condizione tromboembolica.

Si lega, attraverso una specifica sequenza pentasaccaridica, all'antitrombina III (un inibitore delle proteasi a serina), potenziando gli effetti di inibizione della trombina (fIIa) e del fXa, due proteasi fondamentali della cascata della coagulazione del sangue. La durata di azione varia da 1.5 a 4 ore e viene distrutta dall'eparinasi presente nel sangue.

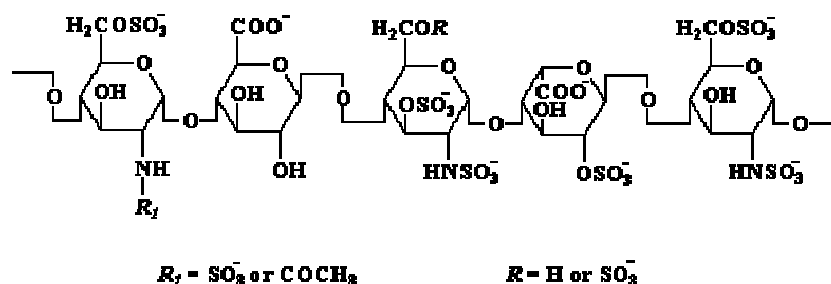


Figura 1.3: struttura dell'eparina

Eparine ad alto peso molecolare (eparina non frazionata): eparina standard, contiene mucopolisaccaridi con peso molecolare da 5 a 30 kDa; ha elevata affinità per l'antitrombina II e induce significativi effetti anticoagulanti *in vivo*.

Eparine a basso peso molecolare (LMWH, *Low Molecular Weight Heparin*): hanno peso molecolare da 4 a 6 kDa, sono isolate da frazioni di eparina tramite filtrazione o precipitazione differenziale con etanolo. Sono più selettive rispetto all'eparina convenzionale, perché hanno maggiore attività nei confronti del fattore Xa rispetto alla trombina.

Fondaparinux: pentasaccaride solfato di origine sintetica, basato sulla porzione attiva dell'eparina (figura 1.4). Lega in modo specifico e attiva l'antitrombina III portando all'inattivazione indiretta del fXa. Essendo sprovvisto della lunga catena polisaccaridica richiesta per legare anche la trombina, il complesso fondaparinux/antitrombina III inibisce soltanto il fX, che non richiede sequenze aggiuntive di legame oltre al pentasaccaride .

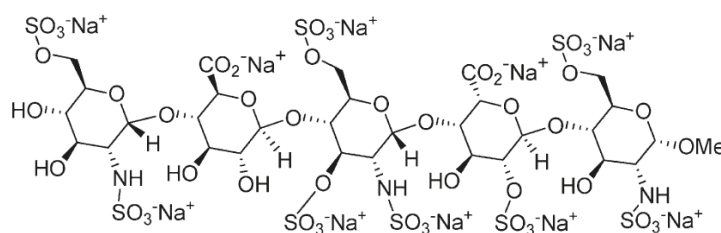


Figura 1.4: fondaparinux sodium (Pinto *et al.*, 2010)

1.3.3. Inibitori diretti della trombina (DTI, *Direct Thrombin Inhibitors*)

I DTI legano ed inattivano sia la trombina libera che quella legata alla fibrina. A differenza dell'eparina, si legano direttamente al sito attivo della trombina e non richiedono antitrombina III attivata come cofattore per la loro attività anticoagulante. Questi agenti inibiscono solo la trombina, mentre l'eparina inibisce anche i fattori IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa. I DTI legano e bloccano la trombina in tre differenti domini: il sito catalitico e due esositi. Tra questi troviamo:

Irudina: piccola proteina di 65 amminoacidi che ha potenti e specifici effetti inibitori sulla trombina formando un complesso 1:1 con essa.

Lepirudina e desirudina: derivati ricombinanti dell'irudina approvati per il trattamento della trombocitopenia indotta da eparina (HIT, *Heparin Induced Thrombocytopenia*). Sono inibitori bivalenti, che legano sia il sito attivo sia l'esosito-1 della trombina, inattivandola in maniera irreversibile; il risultato è che i due farmaci inibiscono sia la trombina libera sia quella legata alla fibrina.

Bivalirudina: peptide di 20 amminoacidi approvato per l'uso in pazienti con angina instabile sottoposti ad interventi percutanei coronarici. E' un inibitore della trombina a rapida insorgenza d'azione, lega sia il sito attivo sia l'esosito-1 della trombina, inattivandola in maniera reversibile.

Argatroban: peptidomimetico che lega selettivamente il sito catalitico della trombina come inibitore competitivo univalente, approvato per la profilassi e il trattamento della trombosi in pazienti con l'HIT. E' disponibile come miscela di due diastereoisomeri.

1.3.4. Antiaggreganti piastrinici

Le piastrine sono un altro sito utilizzabile per regolare la coagulazione del sangue e la successiva formazione del trombo. Questi farmaci inibiscono l'attivazione delle piastrine durante la coagulazione del sangue con diversi meccanismi.

- **Inibitori delle COX-1**

Il TXA₂ è un potente vasocostrittore e un debole induttore dell'aggregazione piastrinica. L'inibizione delle cicloossigenasi, enzima chiave nella biosintesi del TXA₂, dà un effetto antiplastrinico.

Aspirina: acetila e disattiva in modo irreversibile la COX-1 e il suo effetto antitrombotico permane per tutto l'arco di vita della piastrina. Ha anche effetti antitrombotici non correlati alla sua azione sulla COX-1, come l'inibizione dose-dipendente della funzione piastrinica e l'aumento della fibrinolisi.

Triflusal: simile all'aspirina ma assorbito e metabolizzato rapidamente. Inibisce la fosfodiesterasi che porta ad un aumento dei livelli di cAMP con inibizione dell'aggregazione piastrinica attraverso diminuzione della mobilizzazione di ioni calcio. Stimola inoltre la sintesi di ossido nitrico (NO) nei neutrofili con risultante effetto vasodilatatore.

Sulfinpirazone (Anturane): simile al fenilbutazone ma senza attività antiinfiammatoria. E' inibitore irreversibile, l'attività antitrombotica dura finché rimane nel sangue (46 ore).

Indobufene: inibitore reversibile della COX-1 piastrinica molto potente, ha efficacia clinica paragonabile all'aspirina o al warfarin nella prevenzione secondaria di eventi tromboembolici, previene la trombosi venosa profonda dopo infarto miocardico e il blocco dell'aggregazione piastrinica indotta da esercizio fisico.

- **Inibitori della fosfodiesterasi**

La fosfodiesterasi-3 (PDE-3) è l'enzima responsabile della degradazione di cAMP e AMP nelle piastrine e nei vasi sanguigni. Gli inibitori selettivi della PDE-3 inibiscono la degradazione del cAMP, aumentandone la concentrazione intracellulare, con conseguente inibizione dell'aggregazione piastrinica e vasodilatazione.

Dipiridamolo: derivato pirimidopirimidinico, la sua azione sulla funzione piastrinica è legata all'aumento della concentrazione di cAMP attraverso inibizione dell'enzima PDE3. In combinazione con l'aspirina è usato nella prevenzione di eventi trombotici.

Cilostazolo (Pletal): derivato chinolonico, più selettivo del dipiridamolo nell'inibire la PDE3.

- **Antagonisti dei recettori piastrinici purinergici P2Y**

Nelle piastrine, i bersagli molecolari dell'ADP sono recettori purinergici P2Y. Il legame dell'ADP al recettore purinergico P2Y1 induce il cambiamento di forma delle piastrine, la mobilizzazione del calcio intracellulare e l'inizio dell'aggregazione piastrinica. Il successivo legame dell'ADP all'altro recettore purinergico P2Y12 porta ad un notevole aumento dell'aggregazione piastrinica attraverso inibizione dell'adenilato ciclasi e conseguente decremento dei livelli cellulari di cAMP.

Ticlopidina (Ticlid) e Clopidogrel (Plavix): sono tienopiridine che inibiscono l'aggregazione piastrinica, prolungando il tempo di coagulazione e ritardando la retrazione del coagulo, utilizzate nel trattamento delle patologie delle arterie periferiche e, in combinazione con l'aspirina, nelle sindromi acute (figura 1.5).



- **Antagonisti del recettore GPIIb/IIIa**

I recettori funzionali GPIIb/IIIa, chiamati anche integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, sono glicoproteine recettoriali, espresse indipendentemente dall'origine dello stimolo che innesca la cascata della coagulazione e il loro normale substrato è il fibrinogeno. Una molecola di fibrinogeno funge da collegamento tra due piastrine attraverso il legame con due recettori GPIIb/IIIa. Se la superficie è occupata da un altro substrato, che impedisce il legame con il fibrinogeno, non si ha aggregazione piastrinica.

Abciximab: anticorpo chimerico umano-murino rivolto contro i recettori GPIIb/IIIa.

Eptifibatide: eptapeptide ciclico formato da 6 amminoacidi; è considerato un inibitore reversibile dell'aggregazione piastrinica.

Tirofiban: fa parte della classe di agenti chiamati “fibani”, che bloccano il legame del fibrinogeno al recettore GPIIb/IIIa in modo reversibile; così come l'eptifibatide, si dissocia rapidamente dal recettore.

1.3.5. Agenti trombolitici

- **Agenti trombolitici di prima generazione**

Streptochinasi (Streptase): proteina purificata da brodo di coltura di streptococchi β -emolitici di gruppo C. Si attiva legandosi al plasminogeno formando un complesso 1:1, che agisce convertendo il plasminogeno non complessato in plasmina, che è l'enzima fibrinolitico attivo. Il complesso non solo degrada il coagulo di fibrina, ma catalizza anche la distruzione del fibrinogeno e dei fattori V e VII della coagulazione .

Urochinasi: si ottiene da cellule renali e degrada direttamente la fibrina e il fibrinogeno.

- **Agenti trombolitici di seconda generazione**

Alteplasi (Activase): è il tPA umano non modificato, una proteasi a serina con bassa affinità per il plasminogeno libero ed altissima affinità per il plasminogeno legato alla fibrina in un trombo. E' un agente fibrino-specifico.

Prourochinasi (scuPA, r-ProUK): attivatore del plasminogeno simile all'urochinasi.

- **Agenti trombolitici di terza generazione**

Attualmente sono in fase di sperimentazione clinica farmaci derivati da modificazioni strutturali dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA).

Reteplasi (Retavase): è un agente trombolitico fibrino-specifico che deriva dall'alteplasi per perdita dei primi 172 amminoacidi, che fa sì che abbia una ridotta eliminazione epatica.

Tenecteplasi (TNKase): differisce dall'alteplasi in tre punti che portano ad un prolungamento dell'emivita (Lemke e Williams, 2010).

Capitolo 2

In questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata rivolta ai progressi degli ultimi anni sugli inibitori diretti della trombina (fattore IIa) e sulla progettazione di nuovi farmaci inibitori del fattore Xa (fattore di Stuart-Power), due *target* ampiamente validati che operano in posizioni chiave della cascata coagulativa.

Ho ritenuto di particolare interesse affrontare questo argomento in quanto ritengo che l'avvento di anticoagulanti orali che non necessitano di monitoraggi periodici frequenti possa apportare notevoli benefici per i soggetti affetti da disturbi tromboembolici cronici (Harenberg *et al.*, 2012).

Negli ultimi 50 anni le terapie standard prevedevano l'utilizzo di antagonisti della vitamina K, quali il warfarin, composti che agiscono come inibitori indiretti degli enzimi della cascata coagulativa sopprimendo la reazione essenziale di γ -carbossilazione vitamina K-dipendente del glutammato nei domini che ne sono ricchi.

Questi farmaci mostrano carenze per la lenta insorgenza di azione, la variabilità tra pazienti e le interazioni farmaco-farmaco e farmaco-alimenti, hanno inoltre un profilo di sicurezza compromesso e richiedono un regolare monitoraggio clinico.

Il forte interesse dell'industria farmaceutica nello sviluppo di nuovi farmaci anticoagulanti ha fatto sì che quest'area di ricerca di nuovi farmaci sia la più intensiva degli ultimi tre decenni.

La scoperta dei nuovi farmaci è stata notevolmente influenzata dall'introduzione concomitante di nuove tecnologie e metodi nel settore:

l'introduzione dell'*High Throughput Screening* (HTS); il miglioramento delle possibilità e della produttività della cristallografia delle proteine, un aumento dell'approccio chimico combinatoriale e un significativo aumento dei metodi e della velocità di applicazioni di chimica computazionale. L'impatto di queste nuove metodiche è evidente nell'analisi dell'origine dei nuovi farmaci anticoagulanti, progredita con successo fino alla sperimentazione clinica.

La conoscenza delle strutture tridimensionali dei *target* fIIa e fXa ha influenzato la mentalità dei chimici farmaceutici ed ha ispirato la loro creatività, determinando il perseguimento di strategie di ricerca più sicure ed efficaci (Nar, 2012).

2.1. Test per la sperimentazione dei farmaci

L'attività inibitoria degli anticoagulanti può essere valutata con diversi tipi di metodi. I saggi che impiegano proteasi della coagulazione purificate e substrati sintetici sono comunemente utilizzati per la caratterizzazione iniziale dell'affinità di inibitori sintetici nei confronti del loro enzima bersaglio. Modifiche a questi metodi possono essere utilizzate per misurare l'attività degli inibitori in campioni di sangue come, ad esempio, il saggio anti-Xa che può essere usato con le LMWH, il *fondaparinux* o altri inibitori sintetici.

Gli anticoagulanti possono essere ulteriormente caratterizzati mediante saggi della coagulazione (compreso il tempo di protrombina (PT) e il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPPT)) che misura il tempo per la formazione di un coagulo di fibrina dopo l'aggiunta, al sangue intero o al plasma, di un attivatore della coagulazione.

I saggi della coagulazione possono essere usati sia per la caratterizzazione della potenza dei composti *in vitro* che per valutazioni su animali da laboratorio o su esseri umani *ex vivo*.

La potenza *in vitro* viene convenzionalmente indicata come la concentrazione di inibitore necessaria per produrre un raddoppio della disinibizione del tempo di coagulazione (PT2x; aPTT2x).

Un altro metodo di laboratorio utile è il test di generazione della trombina (TG) che misura le variazioni tempo-dipendenti della concentrazione di trombina (Pinto *et al.*, 2010).

2.2. Le serina proteasi

Nella cascata coagulativa il fattore Xa, IIa, VIIa e IXa fanno parte della famiglia delle proteasi a serina tripsino-simili (TLSPs, *Tripsine-Like Serine Proteases*) (Young, 2011).

La struttura biologica della famiglia delle tripsine delle proteasi a serina risale ai primi anni '70, quando è stata determinata la prima struttura cristallina di chimotripsina e tripsina (Nar, 2012).

Le serina proteasi sono una tipologia di enzimi proteolitici, che catalizzano l'idrolisi di legami peptidici (ammidici) con diverse specificità per le catene laterali dei residui amminoacidici che affiancano il legame peptidico che deve essere scisso.

Tutti questi enzimi hanno una Ser reattiva e una His essenziale per la catalisi. Ognuna di queste proteine è ripiegata in due domini, entrambi contenenti

estese regioni a struttura β antiparallela disposte a barile (*barrel*), ma con poche regioni ad elica.

Le strutture indicano che anche l'Asp è presente in tutte le serina proteasi ed è sepolta in una tasca vicina, inaccessibile al solvente.

Questi tre residui invariati formano una costellazione stabilizzata da legami ad idrogeno chiamata **triade catalitica** (figura 2.1) (Voet *et al.*, 2001).

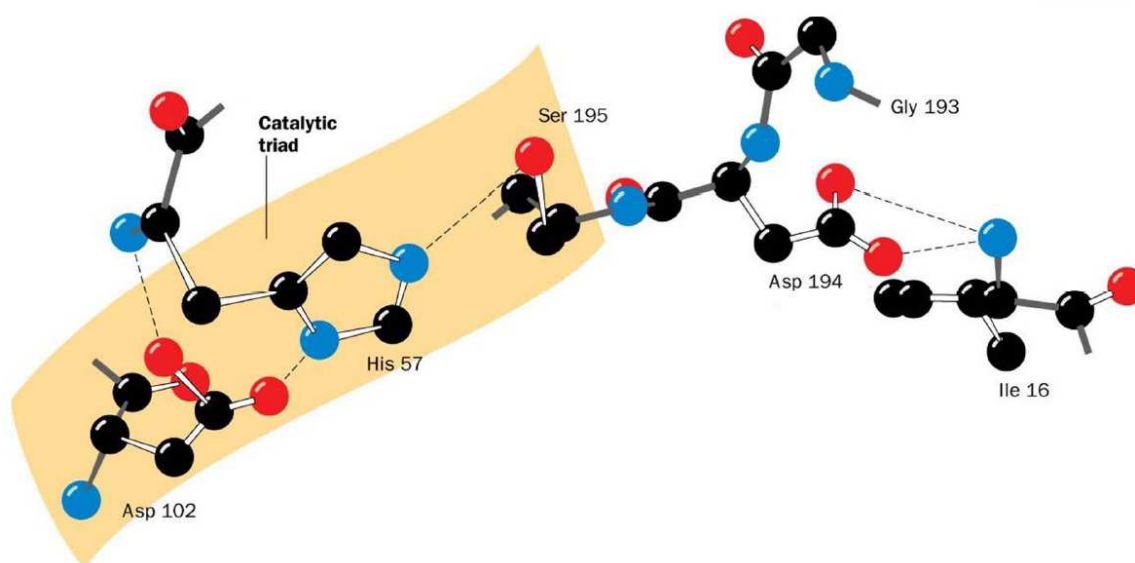


Figura 2.1: triade catalitica stabilizzata da legami ad idrogeno (Voet *et al.*, 2001)

Storicamente i residui di Ser erano gli obiettivi per l'inibizione irreversibile da parte di molecole reattive come bromochetoni o aldeidi, ma sono stati sorpassati e sostituiti da approcci covalenti che riguardano la competizione con l'enzima (Young, 2011).

2.2.1. Meccanismo catalitico delle proteasi a serina

Il meccanismo viene riferito alla chimotripsina ma è applicabile a tutte le serina proteasi e ad altri enzimi idrolitici (figura 2.2).

La reazione procede con (1) l'attacco nucleofilico della Ser del sito attivo all'atomo di carbonio carbonilico del legame peptidico suscettibile per formare l'intermedio tetraedrico; (2) la trasformazione dell'intermedio tetraedrico nell'intermedio acil-enzima mediante catalisi acida generale effettuata dall'His presente nel sito attivo e polarizzata dall'Asp, seguita dalla perdita del prodotto amminico e dalla sua sostituzione con una molecola d'acqua; (3) il processo inverso del (2), che porta alla formazione di un secondo intermedio tetraedrico, e (4) il processo inverso dell'(1), che porta al rilascio del prodotto carbossilico della reazione e rigenera l'enzima nella sua forma attiva (Voet *et al.*, 2001).

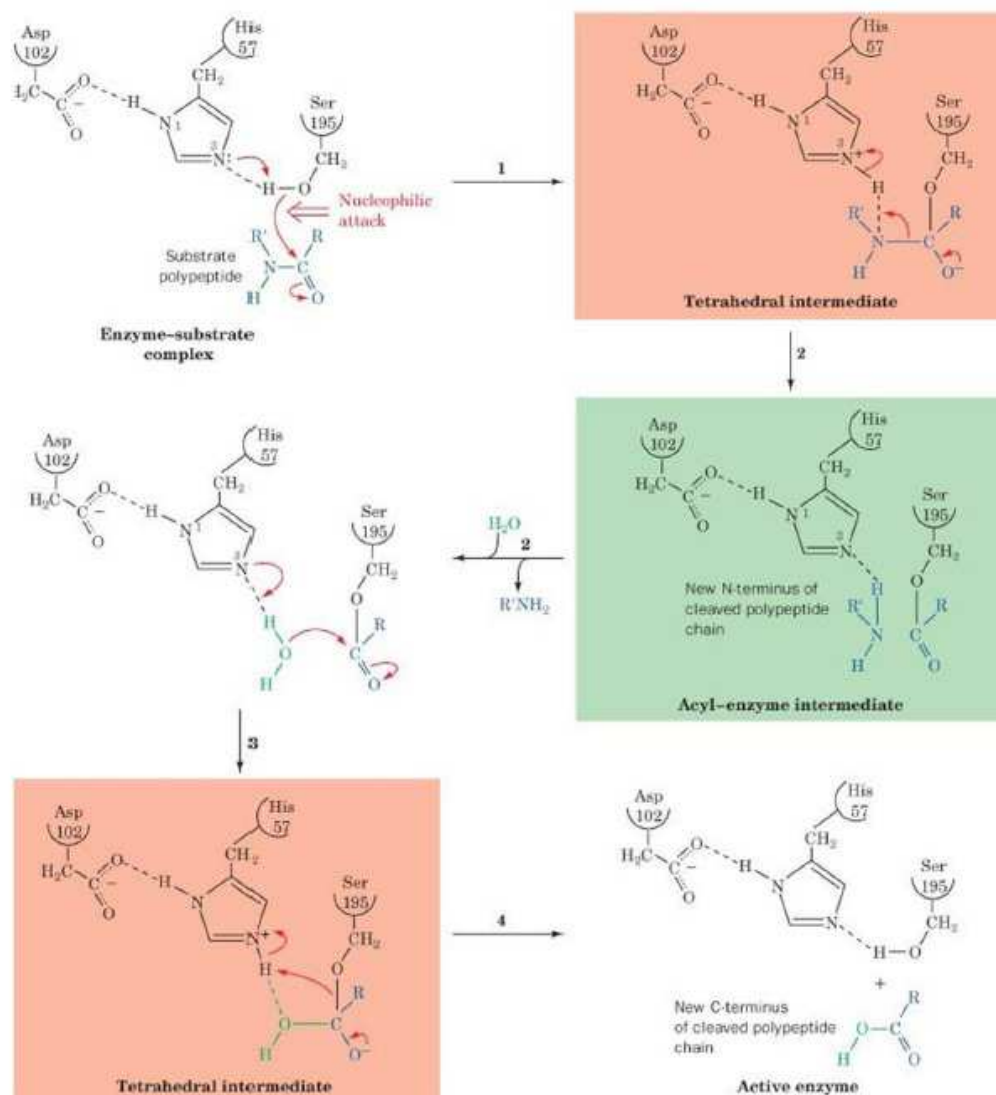


Figura 2.2: meccanismo catalitico delle proteasi a serina.

Quando il substrato si lega all'enzima, l'atomo di carbonio carbonilico del legame peptidico suscettibile viene distorto dal punto di vista conformazionale in modo da potersi legare nel buco dell'ossanione. Questo avviene quando l'intermedio tetraedrico, provvisto di carica negativa, entra nel foro ossianionico e forma un legame a idrogeno con gruppi NH dello scheletro di Gly193 e di Ser195. La conseguente distorsione conformazionale

consente al gruppo NH del residuo (che precede il legame peptidico suscettibile) di formare un legame idrogeno, altrimenti impossibile, con Gly193. Le serina proteasi quindi legano preferibilmente l'intermedio tetraedrico (figura 2.3) (Kraut *et al.*, 1972).

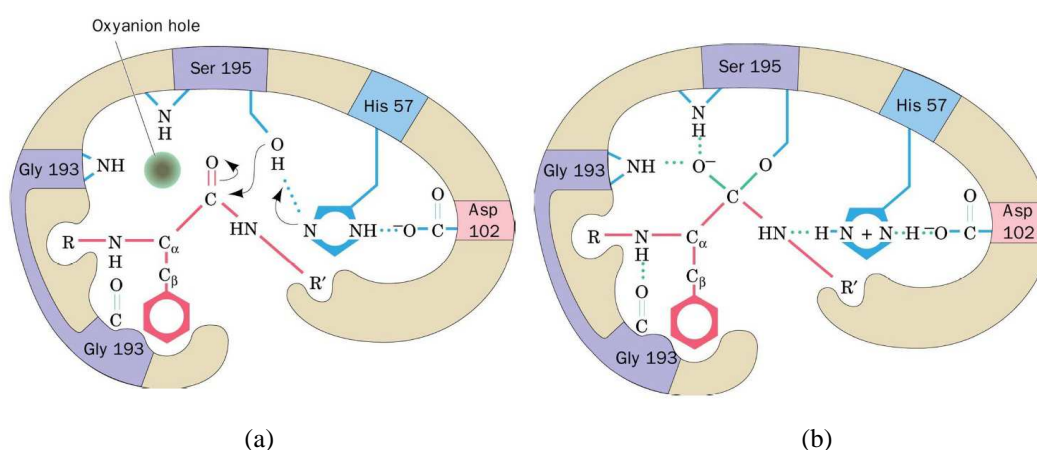


Figura 2.3: stabilizzazione dello stato di transizione: il substrato si lega all'enzima (a); intermedio tetraedrico (b)

2.2.2. Struttura delle proteasi a serina

Il fIIa viene attivato dal precursore protrombina (fattore II), e la sua forma attiva (α -trombina) è costituita da una catena leggera di 36 aa legata covalentemente da un ponte disolfuro al dominio peptidasico di 259 aa.

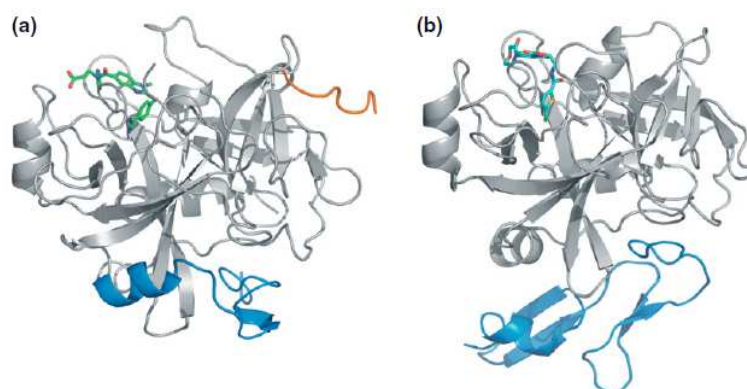


Figura 2.4: strutture molecolari degli enzimi target fIIa (a) e del fXa (b) (Nar, 2012)

Il fXa, invece, è generato per scissione dal suo zimogeno, il fattore X, per distacco di un peptide di attivazione di 52 aa. Esso comprende un dominio catalitico di 254 aa legato ad una catena leggera di 142 aa che contiene a sua volta un dominio GLA e due domini simili a EGF (*EGF-like* 1 e 2) (figura 2.4).

I siti attivi di fIIa e fXa sono strutturati per specifiche scissioni catalitiche di substrati fisiologici.

FIIa scinde, tra le altre, le sequenze GlyGlyGlyValArg-GlyPro e PhePheSerAlaArg-GlyHis rispettivamente nei fibrinopeptidi A e B. FXa scinde le sequenze PhePheAsnProArg-ThrPhe e TyrIleAspGlyArg-IleVal nella protrombina (Nar, 2012).

La tasca specifica primaria, che riconosce la catena laterale del primo residuo in direzione dell'N-terminale del peptide scisso, è chiamata S1. Nelle tripsine (e relative TLSPs) questa tasca riconosce i residui basici amminici (Lys o Arg), attraverso la formazione di un ponte salino tra una funzione amminica (nella Lys) o guanidinica (nella Arg) e un residuo di aspartato nella base di una tasca che altrimenti sarebbe piuttosto idrofobica. Le caratteristiche di

questa tasca hanno avuto un impatto importante sulla progettazione degli inibitori fXa e fIIa (Young, 2011).

2.2.3. Nomenclatura dei siti di legame delle serina proteasi

Schechter e Berger svilupparono una nomenclatura molto utile per descrivere il prototipo del sito di legame delle serina proteasi, nomenclatura che è stata ampiamente usata fino ad ora (Schechter e Berger, 1967).

I subsiti vengono indicati con la simbologia S1, S2, e così via, a partire dal sito catalitico verso l'estremità N-terminale dell'enzima e con S1', S2', e così via, verso l'estremità C-terminale. Essi legano i corrispondenti amminoacidi del substrato amminoacidico accolto nel sito di specificità, che vengono indicati con P1, P2, ecc e P1', P2' e così via. (figura 2.5)

Le serina proteasi scindono il peptide a livello del legame ammidico. (Perona *et al.*, 1995)

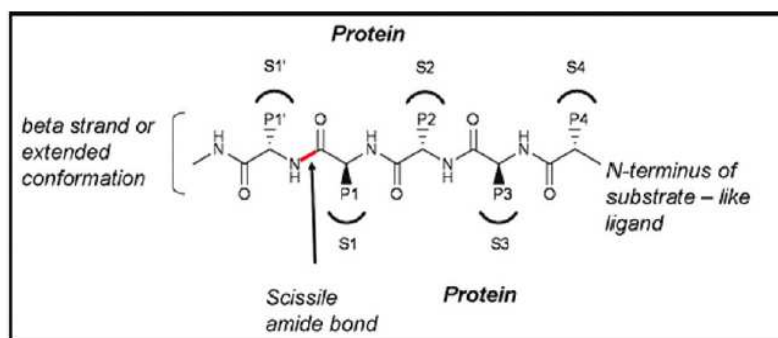


Figura 2.5: nomenclatura delle serina proteasi secondo le convenzioni di Schechter and Berger (Pinto *et al.*, 2010)

Nell'avanzare delle scoperte degli inibitori delle proteasi questa convenzione è stata utilizzata anche per indicare le substrutture dei farmaci, il cui legame è simile a quello dei substrati amminoacidici. Tutti gli inibitori delle proteasi a serina descritti in letteratura legano in S1 e in uno o più dei rimanenti subsiti (Pinto *et al.*, 2010)

2.3. Struttura della proteasi fIIa

Il sito di legame del fIIa può essere suddiviso in diversi subsiti (tabella 2.1): la tasca profonda S1 nella quale si trova l'Asp189 che forma un ponte salino con porzioni caricate positivamente; la tasca S2 o triade catalitica, formata da His57, Asp102 e Ser195; la tasca S3 formata, invece, da Gly216 (posizione 264); un *loop* che forma la tasca P (prossimale) idrofobica, costituita da Tyr60A, Pro60B, Pro60C e Trp60 (posizioni 83-86), presente solo nel fIIa e non nel fXa; ed infine la regione S4, chiamata anche tasca D (distale), delimitata dai residui Leu99, Ile174, Trp215 e Gly217 (Murcia, 2006).

2.4. Struttura della proteasi fXa

Il sito di legame fXa è definito dai subsiti S1 e S4 e dai residui circostanti (tabella 2.1). S1 è una profonda fessura idrofobica, sul fondo della quale si trovano le catene laterali dell'Asp189 e della Tyr228.

S4 è una tasca fortemente idrofobica principalmente definita dalle catene laterali di Tyr99, Phe174 e Trp215. I più potenti ligandi riportati in letteratura si legano invariabilmente ad entrambi i siti.

La selettività è un problema significativo nello sviluppo di inibitori del fattore Xa poiché, come discusso in precedenza, più proteasi a serina tripsino-simili hanno un ruolo fondamentale nella regolazione della cascata coagulativa. La tripsina stessa è un enzima importante per la digestione delle proteine nel tratto gastrointestinale. Sebbene le conseguenze dell'inibizione della tripsina nell'uomo non siano state studiate bene, i risultati ottenuti su animali da laboratorio suggeriscono che si potrebbero manifestare problemi di tossicità in test preclinici. La somministrazione di farmaci per via orale può raggiungere concentrazioni molte volte più alta all'interno del tratto gastrointestinale rispetto a quelle nel sangue; pertanto è importante ottenere un elevato grado di selettività per gli enzimi *target* della coagulazione. Inoltre, la selettività sulla tripsina può essere considerata un test surrogato della selettività degli inibitori nei confronti di altri membri della famiglia delle proteine tripsino-simili.

Una caratteristica che può essere sfruttata per la selettività tra proteasi a serina è la natura della tasca S1, essendo più piccola e lipofila in alcuni e più grande e idrofoba in altri, come nel fXa (Pinto *et al.*, 2010).

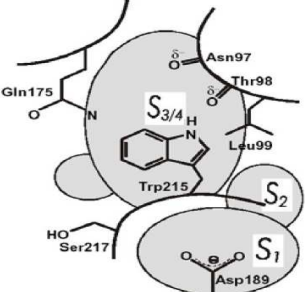
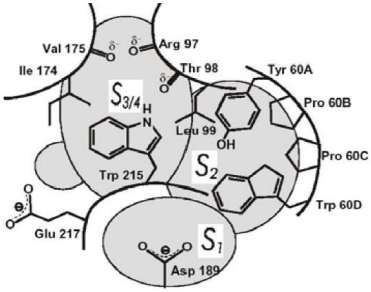
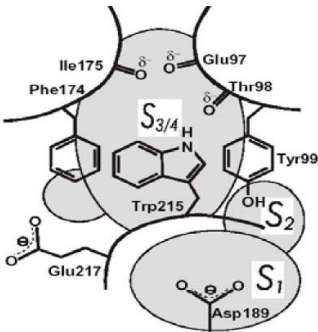
PROTEASI	Tasca S1	Tasca S2	Tasca S3-S4
 <p>tripsina</p>	Asp189	Piccola	Grande
 <p>fattore IIa</p>	Asp189	Grande, idrofobica	Grande, elettronegativa
 <p>fattore Xa</p>	Asp189	Piccola	Grande, molto idrofobica, elettronegativa

Tabella 2.1: strutture delle proteasi a confronto. (Renatus *et al.*, 1998)

Più in dettaglio, può essere osservato che:

Entrambi gli enzimi preferiscono, come residuo precedente il legame peptidico da scindere, l'arginina (P1 nella nomenclatura Schechter e Berger).

La scissione del legame è facilitata dalla tasca specifica prevalentemente idrofobica (S1) che contiene il residuo di acido aspartico alla sua estremità inferiore (Asp189), che funge da sito di riconoscimento per la catena laterale di base.

I siti S2 dei due enzimi sono invece piuttosto differenti dal punto di vista topologico. Nel fXa, una depressione poco profonda nella superficie rivestita da Tyr99 lascia spazio per piccoli amminoacidi nella posizione P2 (c'è una preferenza per la glicina). Nel fIIa, un avvolgimento attorno al residuo Trp60 occlude una tasca idrofobica che può accettare residui alifatici più grandi come valina e prolina.

I siti S3 di entrambi gli enzimi sono piani ed esposti al solvente. I siti S4, invece, sono nuovamente di carattere idrofobico. Nel fXa è presente una cosiddetta “scatola aromatica” formata dalla disposizione di tre amminoacidi aromatici: Trp215, Tyr99 e Phe174.

FIIa conserva Trp-215 fiancheggiato da due amminoacidi alifatici: Leu99 e Ile174.

A causa dell'orientamento dell'ossigeno carbonilico della Lys96 e Glu97 verso l'estremità superiore della scatola aromatica e la vicinanza del gruppo carbossilato del Glu97, la tasca S4 nel fXa ha propensione a legare non solo con parti idrofobiche, ma anche con gruppi caricati positivamente. Questa parte della tasca S4 è stata quindi definita “cavità cationica” (figura 2.6) (Nar, 2012).

Gli antagonisti in generale stabiliscono contatti con questa tasca relativamente grande S4 del fXa. Un diverso adattamento di composti inibitori ai siti di proteasi simili è richiesto per dar luogo a selettività; ne è un esempio la potenza di inibitori di fIIa, che viene raggiunta attraverso il legame con le tasche più piccole (S2 e S3) con topologia completamente diversa (Young, 2011).

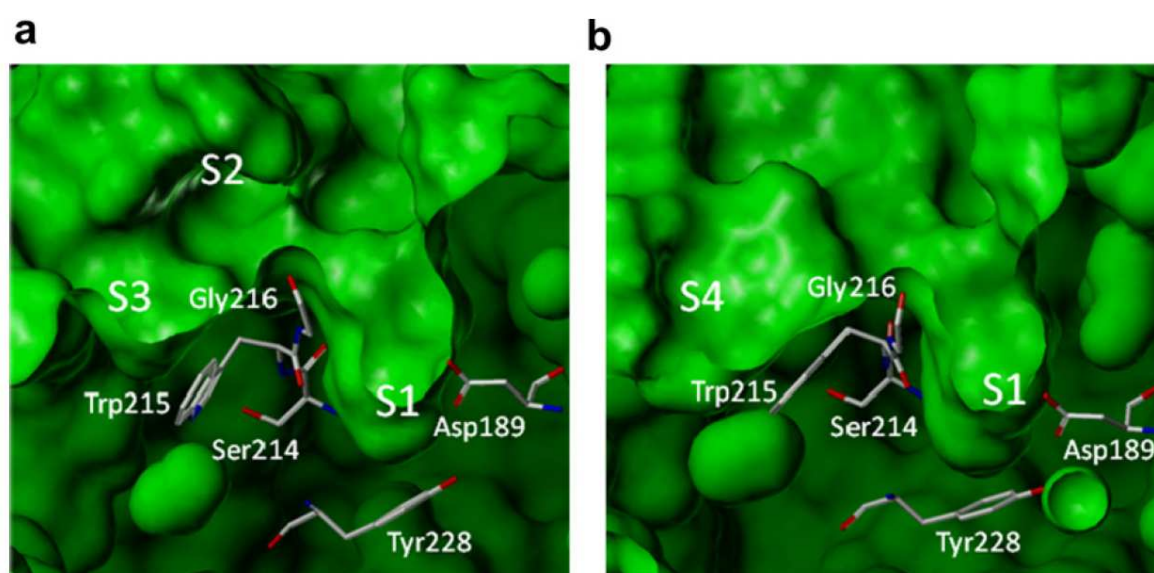


Figura 2.6: strutture cristalline del fIIa (a) e del fXa (b) che mostra la similitudine delle due tasche S1, e la grandezza delle tasche S2 e S3 della trombina a confronto con la tasca S4 del fXa (Nar, 2012)

Capitolo 3

3.1. Inibitori del fattore IIa

Le ricerche degli inibitori del fIIa risalgono al 1980, molto prima che le informazioni strutturali fossero disponibili. I composti sono stati ottenuti utilizzando un modello peptidomimetico che avesse un residuo di arginina P1 come struttura centrale (es. *Argatroban*) oppure un residuo che mimasse l'arginina, come una benzamidina, come nel caso della molecola denominata *NAPAP*.

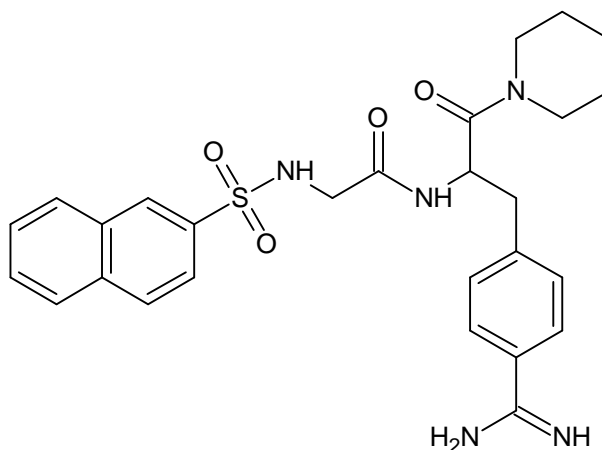


Figura 3.1: struttura del NAPAP

L'ottenimento di una co-struttura NAPAP-fIIa ha permesso di studiare le interazioni tra il *target* e il ligando, evidenziando che la parte amidinica forma un ponte salino con Asp189 situato in profondità nella tasca S1, che offre un'effettiva protezione dal solvente per un'interazione termodinamicamente favorita. Il frammento benzamidinico per se stesso è un inibitore mediamente potente di tutti i membri della famiglia delle tripsine ($K_i \cong 15 \mu\text{m}$). La

funzione piperidinica e gli anelli naftilici occupano la tasca S2 e S4 rispettivamente; la piperidina assume il ruolo del residuo di prolina P2 del substrato e il naftile forma interazioni idrofobiche con S4, più specificamente un'interazione del tipo *edge-on* CH--- π con Trp-215 (figura 3.1), che interessa gli atomi e i legami dell'anello aromatico, a differenza dell'interazione *face-on*, in cui l'attacco avviene nel centro dell'anello aromatico (Imai *et al.*, 2008).

A seguito della pubblicazione della struttura cristallina di fIIa, il gruppo di ricerca di Astra-Zeneca utilizzò l'informazione strutturale in un approccio peptidomimetico per una struttura dipeptidica e sviluppò il potente inibitore *Melagatran* (figura 3.2).

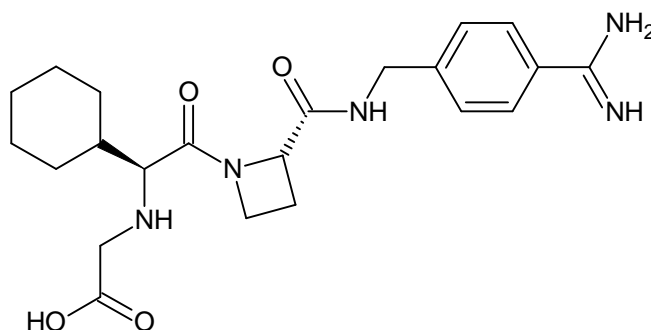


Figura 3.2: struttura del Melagatran

A causa della sua natura zwitterionica il composto stesso ha una scarsa biodisponibilità orale, ma la conversione nel profarmaco *Ximelagatran* ha fornito il primo inibitore diretto del fIIa per gli studi clinici (figura 3.3).

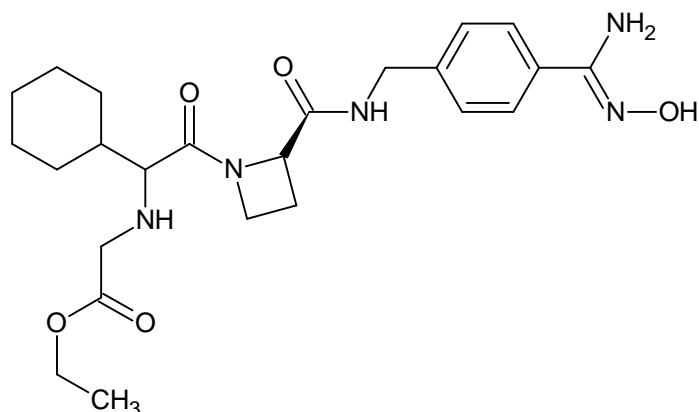


Figura 3.3: Struttura del Ximelagatran

I ricercatori della Boehringer Ingelheim seguirono un approccio simile: partendo dal *NAPAP*, una ricerca basata sulla struttura condusse all'identificazione del *Dabigatran* e al suo doppio profarmaco *Dabigatran etexilato* (figure 3.4 e 3.5).

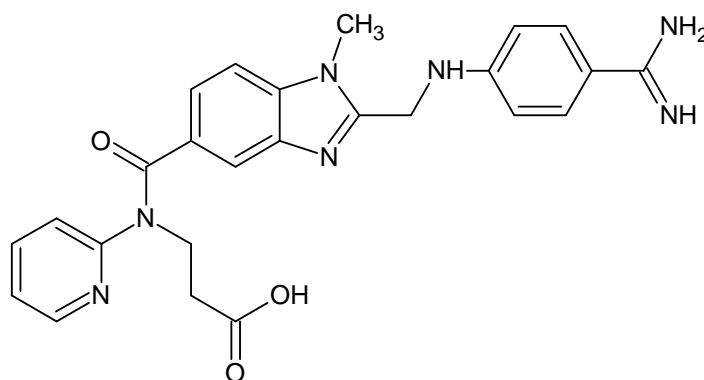


Figura 3.4: struttura del Dabigatran

Molti tentativi paralleli di varie ditte farmaceutiche erano in corso, ma il *Dabigatran etexilato* fu l'unico farmaco biodisponibile per via orale che raggiunse il mercato.

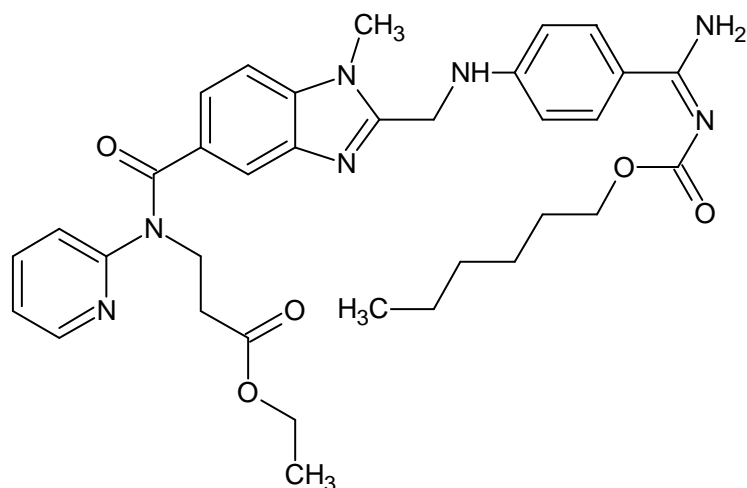


Figura 3.5: struttura del Dabigatran etexilato

Il *Dabigatran* è un potente inibitore reversibile e diretto della trombina (fIIa), con efficacia, profilo di sicurezza e tollerabilità migliori sia rispetto al warfarin che all'*eparina a basso peso molecolare (LMWH)*. *Dabigatran* è stato approvato per la prevenzione dell'ictus nei pazienti con fibrillazione atriale in molti paesi compresi Usa, Canada, Giappone ed Europa, ed è stato approvato in oltre 73 paesi per la prevenzione della trombosi dopo operazioni chirurgiche del ginocchio e dell'anca.

3.2. Scoperta del Dabigatran

Partendo dal *NAPAP* è stato ideato uno *scaffold* diaminofenilico acilato molto semplice (**1**) (figura 3.6), come sostituto della glicina centrale nella molecola del *NAPAP*. Lo scopo era evitare gli elementi strutturali peptidici ed eventualmente sviluppare un nuovo chemiotipo con aumentata stabilità

metabolica. Progressi nell'affinità sono stati ottenuti con il *design* di un composto biciclico (**2**), derivato della struttura (**1**) per chiusura ad anello della parte centrale.

Un'analisi strutturale dei cocristalli ha rivelato che il nucleo benzimidazolico rappresenta un supporto molto favorevole per collocare tre sostituenti essenziali nella orientazione corretta per l'occupazione delle tasche S1, S2 e S4.

Un'ottimizzazione delle due regioni *linker* tra i sistemi aromatici e l'introduzione di una funzione acida carbossilica per diminuire la lipofilità ha portato alla scoperta del composto (**3**), con affinità sensibilmente aumentata e minor legame alle proteine plasmatiche. Usando informazioni dettagliate sulla conformazione del legame con l'enzima di un gran numero di inibitori di questo tipo, è emerso che il rimpiazzamento dello spaziatore solfonamidico con uno carbossamidico poteva mantenere l'orientazione favorevole del gruppo arilico per una forte interazione con la tasca S4 (composto **4**, *Dabigatran*) (Nar, 2012).

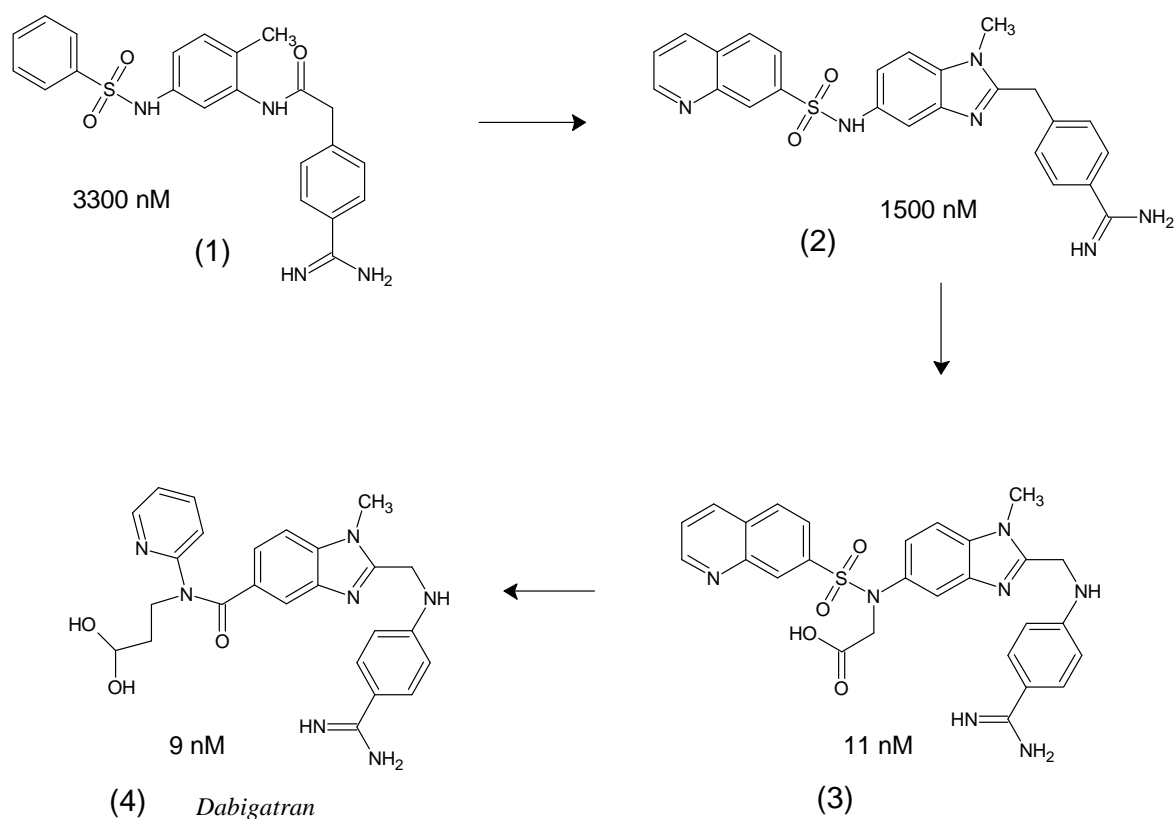


Figura 3.6: evoluzione della scoperta del Dabigatran

Questa ipotesi è stata verificata per la serie di derivati carbossamidici elencati nella tabella 3.1.

Composto	A	<i>n</i>	X	IC ₅₀ (μM)
a	-CH ₂ -	1	CH	0.054
b	-O-	1	CH	0.33
c	-NH-	1	CH	0.010
d	-NH-	2	CH	0.0054
e	-NH-	3	CH	0.010
f = (4)	-NH-	2	N	0.0093

Tabella 3.1: derivati carbossamidici

Delle tre variazioni del *linker* tra il benzamidazolo e il fenile della benzamidina (**composti a-c**), l'ammino derivato (**c**) era il più attivo. I composti (**c-e**) dimostrano che la lunghezza della catena (fino a tre gruppi metilenici) tra il carbossilato e l'azoto ammidico ha un minor effetto sull'attività *in vitro*. Infine, il composto (**f**), corrispondente al *Dabigatran*, mostra che il fenile terminale può essere sostituito dal gruppo 2-piridinico più idrofilo, senza sostanziali perdite di attività.

L'ottimizzazione del gruppo arilico terminale ha permesso di ottenere il *Dabigatran* (**f**=**4**) che è stato, quindi, il risultato di una ricerca strutturale peptidomimetica partendo da un analogo del substrato.

3.2.1. Sintesi del dabigatran

L'acido 4-metilamino-3-nitrobenzoico, per reazione con cloruro di tionile, è stato trasformato nel corrispondente cloruro acido, che è stato fatto reagire con l'estere etilico dell'acido 3-(2-piridinil)-aminopropionico in presenza di trietilammina usando come solvente tetraidrofurano; il nitro gruppo è stato ridotto per idrogenazione catalitica con Pd/C 10%. L'addizione di 4-cianofenilglicina in presenza di carbonildimidazolo ha portato all'intermedio che è stato sottoposto alla chiusura dell'anello benzimidazolico, eseguita in acido acetico concentrato. Il nitrile è stato trasformato nella benzamidina per trattamento prima con HCl gassoso in etanolo e successivamente con carbonato d'ammonio; questo intermedio è stato convertito nel composto (**4**) da un'idrolisi alcalina (figura 3.7).

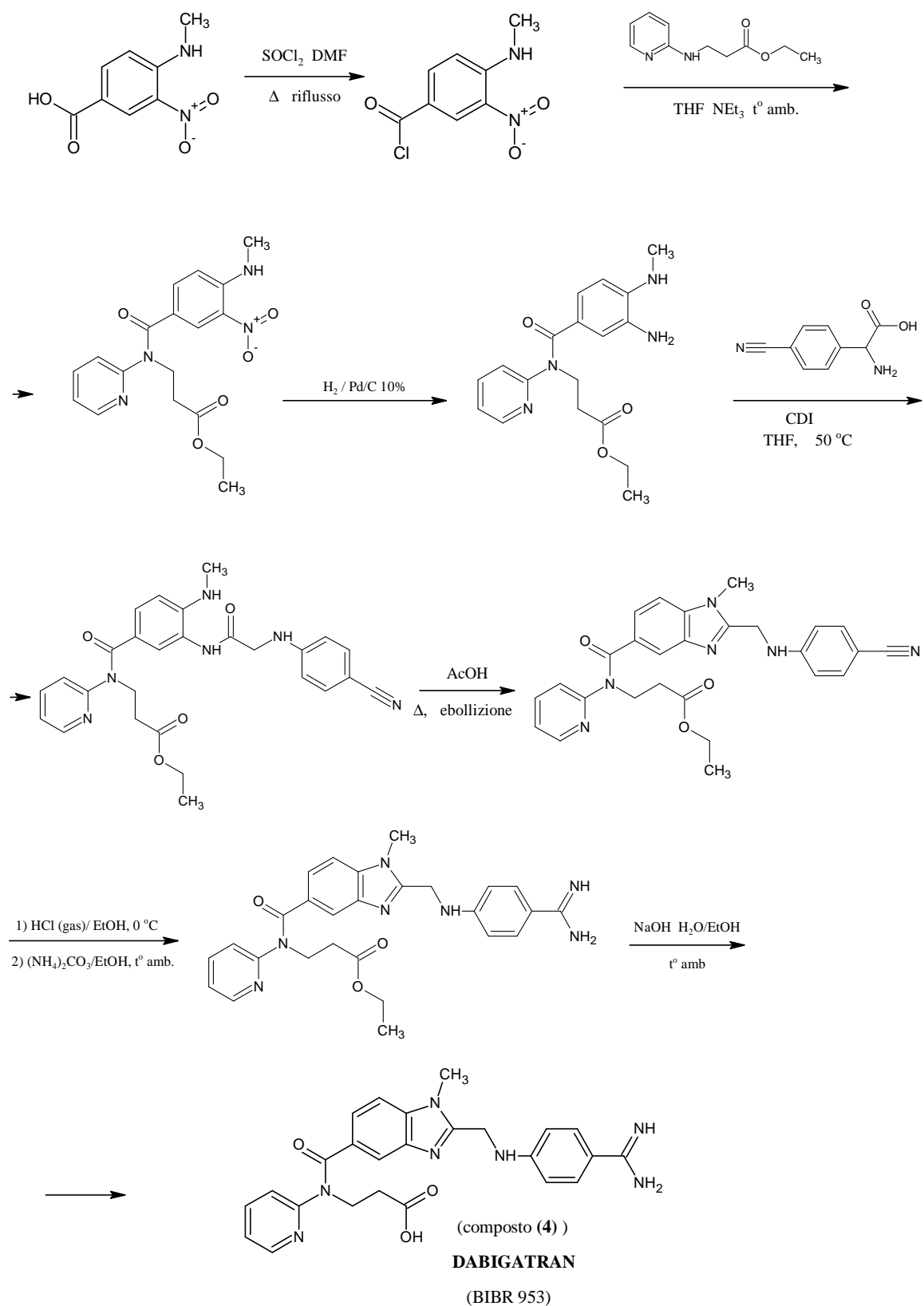


Figura 3.7: sintesi del Dabigatran

La struttura a raggi X del *Dabigatran* complessato con la trombina è mostrata in figura 3.8: l'amidina interagisce con l'Asp189 con un ponte salino bidentato, la struttura centrale è legata alla trombina da interazioni idrofobiche con la tasca P e l'anello piridinico è posizionato tra Leu99 e Ile174 nella tasca D. Come previsto, non ci sono interazioni tra l'enzima e il gruppo carbossilico che è diretto fuori dal sito di legame, verso la regione del solvente.

Questa è una delle caratteristiche più notevoli di questo inibitore, il quale non fa uso del modello di legame a idrogeno con l'enzima, tipico della maggior parte degli inibitori ad alta affinità per la trombina visti finora.

Oltre al ponte salino con Asp189, l'energia di legame del *Dabigatran* deriva soltanto da interazioni idrofobiche; ciò sottolinea l'importanza generale di questa forza di legame nelle interazioni farmaco recettore.

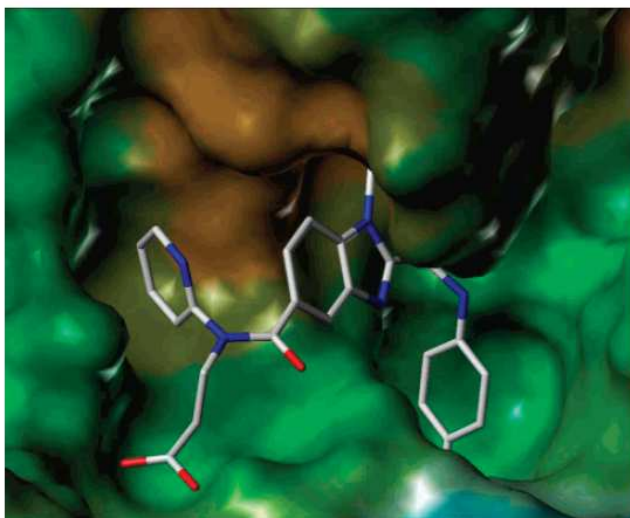


Figura 3.8: Complesso del *Dabigatran* con la trombina (fIIa)

A causa della sua forte attività *in vitro* e il suo favorevole profilo di selettività nei confronti delle proteasi a serina (tabella 3.2), il *Dabigatran* è stato

profondamente studiato e si è rivelato essere un potente anticoagulante *in vivo*. Tra tutti gli inibitori di questa classe strutturale, ha evidenziato potenza di azione maggiore e la più lunga durata d'azione in ratti anestetizzati dopo somministrazione e.v. .

human enzymes	K_i (nM)	human enzymes	K_i (nM)
thrombin	4.5 ± 0.2	plasmin	1695 ± 50
factor Xa	3760 ± 20	tPA	45360 ± 10
trypsin	50.3 ± 0.3	activated protein C	20930 ± 10

^a PTT (human plasma): $ED_2 = 0.23 \pm 0.021 \mu\text{M}$.

monkeys (rhesus) - BIBR1048

Tabella 3.2: profilo dell'attività del Dabigatran

Diversamente dai composti solfonamidici, è stato ben tollerato dagli animali fino alla dose massima di 10 mg/kg. Non era però attivo per via orale, il che non è sorprendente, considerando che si tratta di una molecola molto polare, permanentemente caricata, con un logP di -2,4 (*n*-ottanolo/tampone pH 7,4).

3.3. Dabigatran etexilato

Composti con caratteristiche chimico fisiche come quelle sopra citate possono essere convertiti in profarmaci attivi per via orale funzionalizzando il carbossile come estere e mascherando la porzione ammidinica come estere carbammico, a condizione che sia il carbossile che l'ammidina possano essere ripristinati *in vivo* da una scissione idrolitica del profarmaco. Di conseguenza sono stati sintetizzati una serie di profarmaci di questo tipo come

esemplificato dal *Dabigatran etexilato* (figura 3.9), il quale è un composto piuttosto lipofilo con un valore logP di 2,6 (n-ottanolo/tampone pH 7.4).

Dato per via orale alle scimmie *rhesus*, questo profarmaco mostrava potenti e duraturi effetti anticoagulanti come risultava dal tempo di tromboplastina parziale attivata (aPPT) misurato *ex vivo*.

La reazione del *Dabigatran etil estere* con *n*-esil cloroformiato in acetone e acqua dà O-esil carbammato (derivato *Dabigatran etexilato*) (Hauel *et al.*, 2002) .

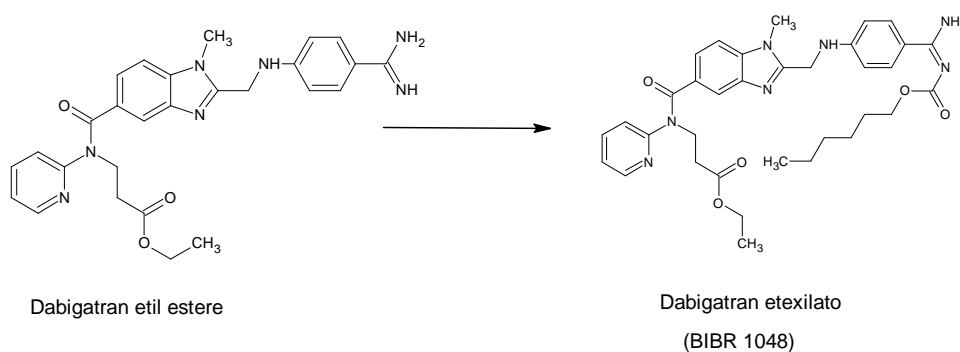


Figura 3.9: sintesi del profarmaco *Dabigatran etexilato*

3.4. Dabigatran e Dabigatran etil estere come inibitori di ribosildiidronicotinammide deidrogenasi (NQO2)

Recentemente è stato individuato un nuovo sito di interazione del Dabigatran con un metodo, applicato per la prima volta, denominato *Capture Compound Mass Spectrometry* (CCMS) (figura 3.10) che unisce chimica farmaceutica, proteomica e *molecular modeling*.

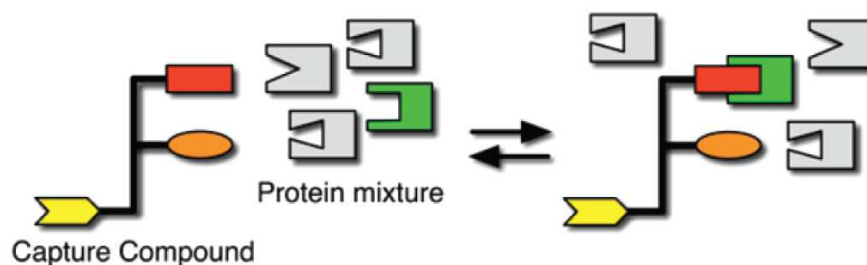


Figura 3.10: rappresentazione schematica delle interazioni del CCMS

Spesso, nel *drug discovery*, si ricerca un ligando selettivo per un determinato *target*. Negli ultimi anni è però apparso con evidenza che molti farmaci efficaci agiscono modulando più proteine, inoltre non tutte le strutture proteiche e i meccanismi d'interazione sono noti.

Dabigatran sembrava avere selettività per il fIIa, ma, con la tecnica CCMS sono stati fatti studi sul profilo d'interazione proteica, sia del *Dabigatran* che del *Melagatran*, per l'identificazione di nuovi siti di legame specifici, utilizzando "sonde" basate su piccole molecole chiamate CCs (*Capture Compounds*). Gli esperimenti CCMS sono stati fatti su cellule derivate da epatociti, HepG2.

Sette proteine soddisfacevano i criteri di interazione, tra cui l'NQO2 (ribosildiidronicotinammide deidrogenasi).

La specifica identificazione dell'NQO2 come sito di interazione con *Dabigatran* ha suscitato molto interesse dato che l'ossidoreduttasi NQO2 sembra essere il bersaglio del *Resveratrolo*, che induce l'inibizione della crescita cellulare tumorale e svolge un importante ruolo di detossificazione nel metabolismo degli xenobiotici. Questo è il motivo per cui diversi inibitori del NQO2 sono stati sviluppati ed esaminati negli ultimi anni.

L'NQO2 è stato infatti confermato come obiettivo specifico di *Dabigatran* e *Imatinib* grazie alle tecniche CCs ed all'identificazione eseguita con spettrometria di massa (CCMS).

E' stato inoltre effettuato il Western Blot utilizzando un anticorpo specifico NQO2 per avere ulteriore conferma della sua identificazione.

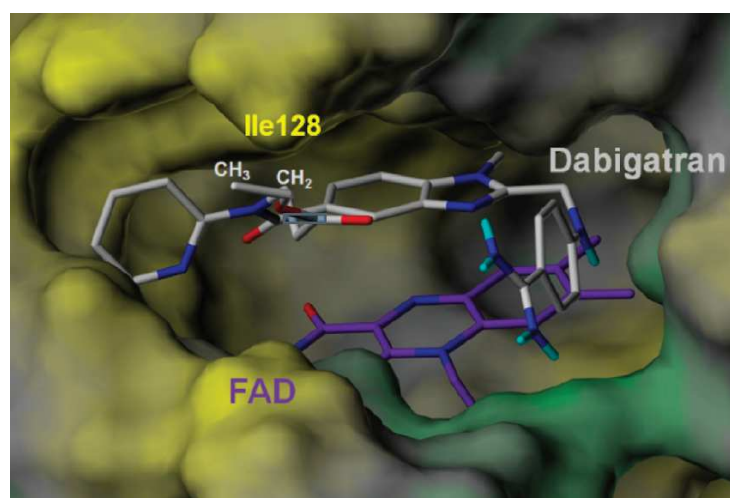


Figura 3.11: legame del Dabigatran etil estere (grigio) al NQO2. Sono illustrati il cofattore FAD (viola) ed i residui delle proteine (verde).

La forma di NQO2 è dimerica e comprende due siti attivi, uno dei quali è la “tasca di legame del chinone”, formata dal FAD legato ad una catena e dai residui di entrambe le catene (figura 3.11); questa tasca può ospitare una

struttura planare, il ligando aromatico, disposto in modo coplanare nel centro redox del flavonoide, stabilizzato da interazioni π : ciò può verificarsi per il nucleo centrale del *Dabigatran* ma non per il *Melagatran*, spiegando così la selettività dell'uno sull'altro. L'ammidina fa parte di una rete di legami a idrogeno, mentre la funzione acida si estende verso il solvente.

Sarebbe quindi interessante studiare ulteriormente i possibili effetti dell'interazione del *Dabigatran* e di NQO2 e il profilo di attività completo di questo farmaco scoprendone eventuali nuove proprietà (Michaelis *et al.*, 2012).

Capitolo 4

4.1. Inibitori del fXa

Le ricerche sugli inibitori del fXa sono state inizialmente fortemente ispirate da un composto identificato da Daiichi, il *DX-9065a* (figura 4.1) (Haginoya *et al.*, 2004). Venne proposto un modello della sua co-struttura con fXa, successivamente raffinato sulla base della co-struttura sperimentale con tripsina, prima che la struttura sperimentale con fXa fosse determinata.

La porzione naftilammidinica del *DX-9065a* si lega alla tasca S1 e forma un ponte salino con Asp-189. La funzione pirrolidinica, che porta l'acetimidoile collegato a ponte dallo *scaffold* dell'acido 2(S)-oxofenilpropionico occupa la tasca S4. L'eterociclo è posizionato perpendicolarmente alla Trp-215 e parallelamente alla Tyr-99 e Phe-174 e forma interazioni π *edge to face* o *face-to-face*.

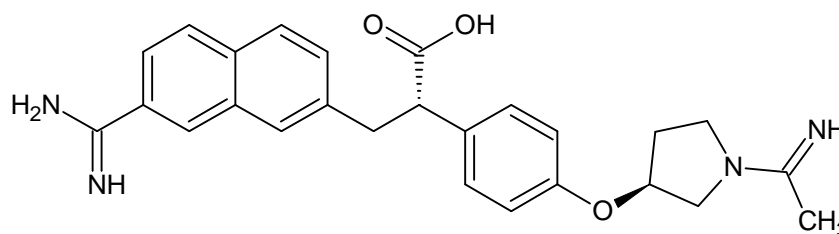


Figura 4.1: struttura del *DX-9065a*

DX-9065a è il primo rappresentante e predecessore di numerosi composti bibasici strutturalmente diversi che vennero progettati per soddisfare i requisiti per interagire con la tasca S1 (interazioni con Asp-189) e con la tasca S4 (cavità cationica) del fXa (figura 4.2) (Nar, 2012).

Nel fXa, come nella trombina e nel fXIa, l'alanina occupa la posizione 190, creando una tasca leggermente più grande e più lipofila della cosiddetta "serina 190" del fVIIa e nel fIXa.

La posizione 192, invece, è più variabile nelle proteasi a serina.

Il composto DX-9065a fornisce un esempio della selettività dipendente dalla posizione 192, dove viene raggiunto un alto livello di selettività per il fXa e la trombina, probabilmente derivante dalla repulsione elettrostatica del ligando carbossilato con la catena laterale del Glu192. Il corrispondente metil estere non è selettivo (Pinto *et al.*, 2010).

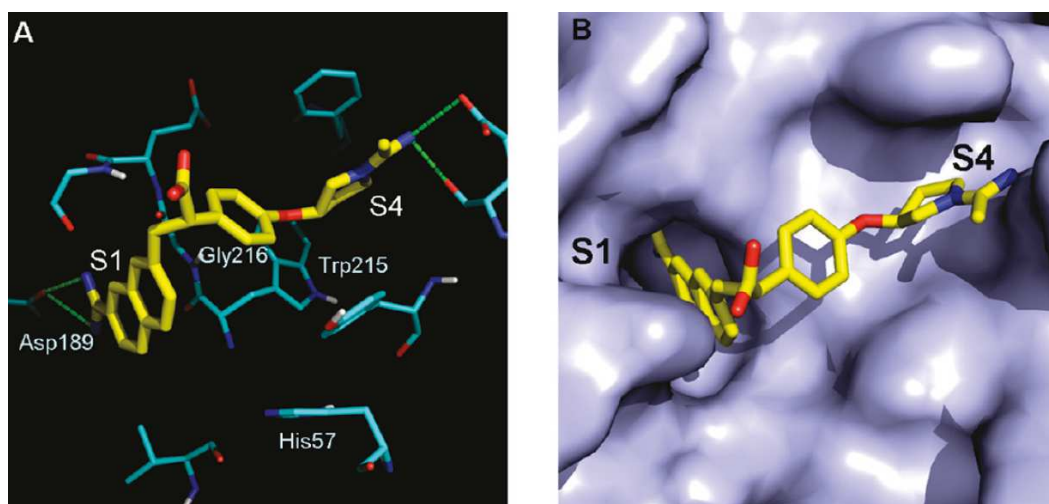


Figura 4.2: legame del DX-9065a al fXa

Per un po' di tempo i composti bi e monobasici vennero progettati da un numero crescente di gruppi di ricerca dell'industria farmaceutica. Tuttavia, alla fine degli anni '90, l'attenzione è stata spostata dai composti molto basici a quelli meno basici fino a composti neutri che favoriscono una migliore biodisponibilità orale senza il bisogno di ricorrere a profarmaci (Nar, 2012).

Nel 1998 venne segnalata la scoperta della struttura cristallina del legame del Tap (*Tick-derived Anticoagulant Peptide*), un peptide anticoagulante naturale isolato da parassiti ematofagi, con fXa (figura 4.4A), nella quale la catena laterale N-terminale della tirosina, inaspettatamente, legava con S1 e una catena laterale dell'arginina legava con S4. Tutti questi risultati contrastavano con le convenzioni secondo le quali un gruppo basico P1 era necessario per formare una forte affinità di legame, ed ha permesso la scoperta della seconda generazione di inibitori delle proteasi tripsino-simili che contengono gruppi P1 neutri con migliori proprietà farmacocinetiche sia per la trombina che per il fXa.

L'inaspettata modalità di legame osservata nella struttura cristallina TAP-fXa (es. un gruppo neutro in S1 e un gruppo basico in S4) è stata rispecchiata nella documentazione di una struttura cristallografica della Sanofi-Aventis, (figura 4.3), nella quale la benzamidina P1 era legata alla tasca S4 e l'aril alogeno P4 era legato in S1, spiazzando una molecola di acqua sopra la Tyr228 con una modalità molto simile agli inibitori della trombina descritti precedentemente (figura 4.4B) (Pinto *et al.*, 2010).

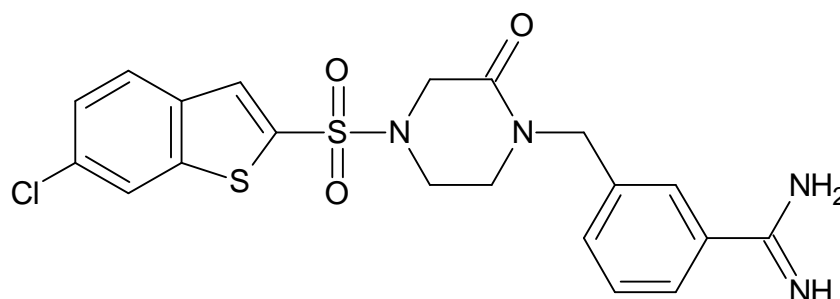


Figura 4.3: inibitore della Sanofi-Aventis

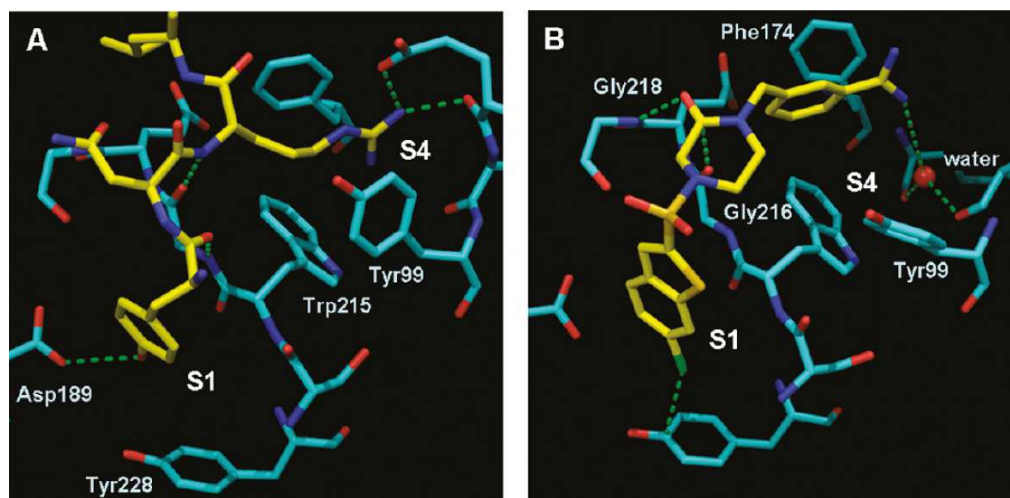


Figura 4.4: complesso TAP-fXa (A); inibitore della Sanofi-Aventis legato al fXa (B)

Da tutti questi sforzi è derivato un certo numero di composti clinici tra cui il *Rivaroxaban* e l'*Apixaban*, che hanno ottenuto l'autorizzazione all'immissione in commercio.

4.2. Scoperta del rivaroxaban

HTS di una collezione di 200000 composti inibitori selettivi del fattore Xa ha dato un numero di prodotti con potenza da media ad alta: composti 5a e 6 (figura 4.5). Senza disporre di informazioni strutturali, fu ipotizzato che un gruppo fosfonio potesse funzionare come arginino-mimetico. La sostituzione con un gruppo metilamidinico produsse il composto *lead* 5b, che venne poi sottoposto ad un programma di ottimizzazione. Si osservò che c'erano SAR poco definite per il lato sinistro del composto, ma valide per la funzione clorotiofenica.

La difficoltà di ottenere un composto con potenza soddisfacente e biodisponibile per via orale portò il gruppo di ricerca della Bayer a rivalutare i composti più deboli allo screening (composto 6). Il trasferimento delle SAR dalla classe del *lead* 5b alla classe del composto 6 per introduzione del cloro sull'anello del tiofene permise di ottenere il composto 7, con un aumento della potenza di 200 volte. L'ottimizzazione dell'anello sul lato sinistro delle molecole portò alla sintesi di *Rivaroxaban* (8) (Roehrig *et al.*, 2005). E' stata ottenuta anche una struttura co-cristallina con fXa, ma apparentemente questa non è stata usata nel design.

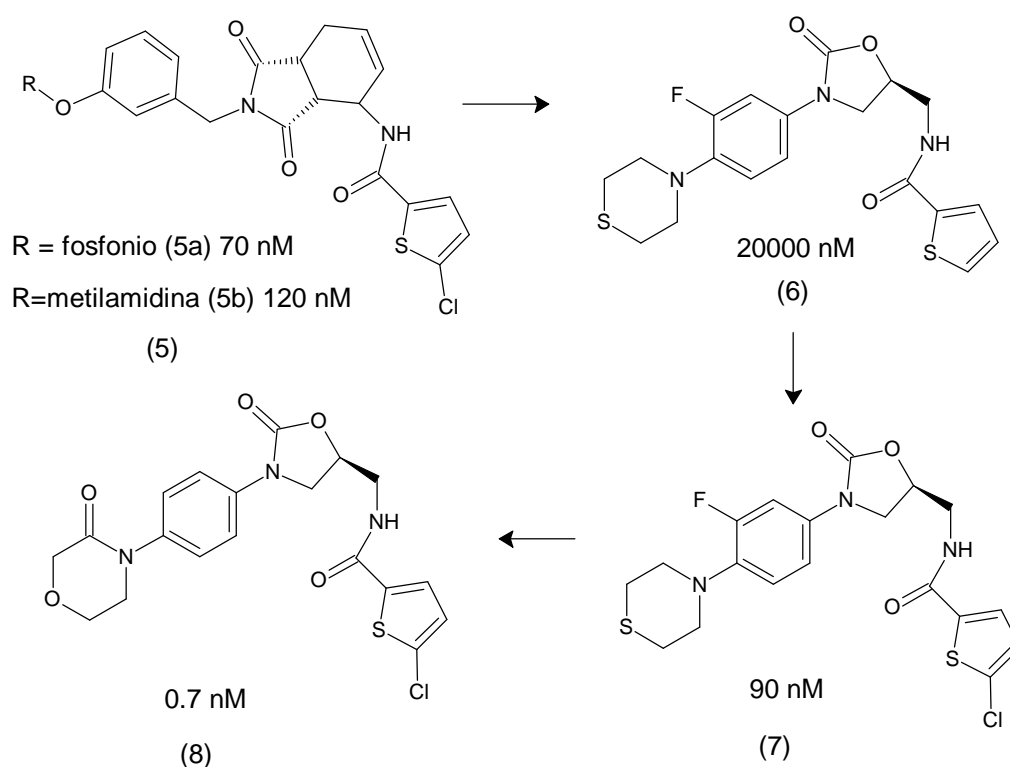


Figura 4.5: evoluzione della scoperta del *Rivaroxaban*.

4.3. Scoperta dell'Apixaban

Anche in questo caso il composto 9 è stato identificato con uno studio HTS (figura 4.6). Successivamente ad uno studio intermedio, attraverso inibitori dibasici bis-benzamidinici, il gruppo BMS (*Brystol-Myers Squibb*) arrivò al composto 10 usando un gruppo neutro o-fenilsolfonammidico P4 nell'intento di ridurre la basicità e aumentare la permeabilità. L'ottimizzazione dello *scaffold* e il cambio della regiochimica del legame dell'azoto fornì un nucleo centrale pirazolico. La straordinaria potenza dei composti benzamidino-sostituiti permise al gruppo di sacrificare un po' dell'affinità in favore della biodisponibilità orale. Scambiando la benzamidina con un gruppo (P1) benzilamminico si ottenne il composto 11 (DPC423). Ricerche continue di gruppi P1 ancora meno basici o neutri e l'irrigidimento della pirazolocarbossamide centrale per ciclizzazione dell'azoto ammidico sul C4 del pirazolo sono tradotti nel composto clinico 12 (*Apixaban*) (Pinto *et al.*, 2007). Un vasto uso delle informazioni strutturali è stato utilizzato durante l'intero processo. Questo è il motivo per cui la scoperta dell'*Apixaban* può essere considerata un caso rappresentativo di *design* basato sulla struttura (Nar, 2012).

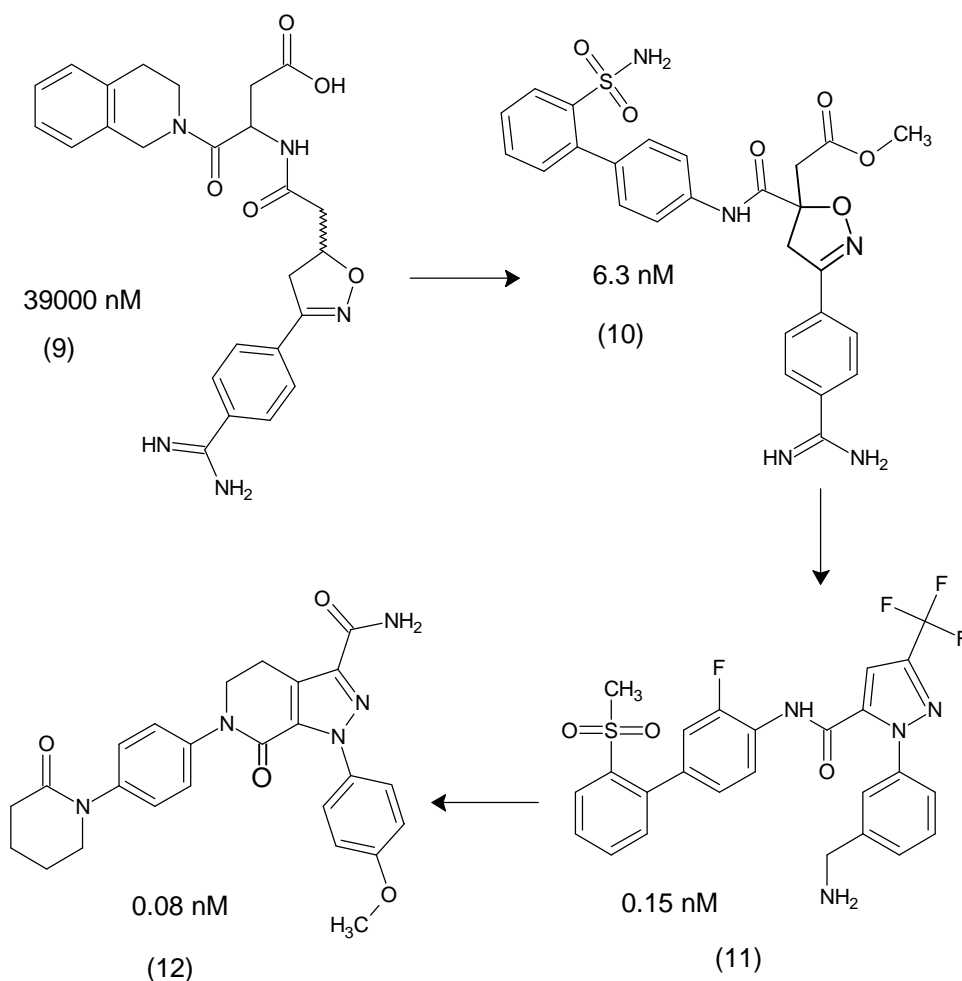


Figura 4.6: evoluzione della scoperta dell'Apixaban.

4.3.1. Interazione dell'Apixaban con il fXa

L'anello dell'anisolo è legato alla tasca S1 con spiazzamento di una molecola di acqua localizzata sopra la Tyr228. Il gruppo metossilico forma contatti con la catena laterale della Val213.

Calcoli di chimica quantistica indicano un debole potenziale di legame a idrogeno dell'ossigeno dell'anisolo, suggerendo che questo sia leggermente

lipofilo. L'ossigeno lattamico del nucleo centrale biciclico forma legami a idrogeno legandosi all'NH della Gly216. La porzione N-fenillattamica P4 lega in profondità nella tasca S4, con il piano dell'ammide lattamica per sovrapposizione con l'anello arilico di Phe174 e Tyr99.

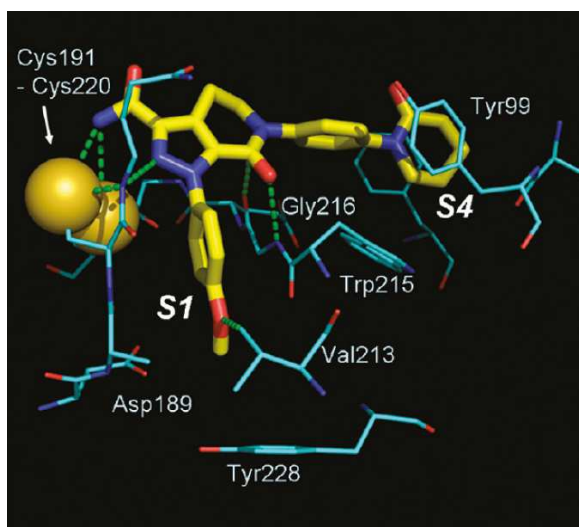


Figura 4.7: struttura cristallografica del legame dell'Apixaban al fXa.

L'alta affinità di legame dell'Apixaban al fXa e degli altri composti (talvolta sub-picomolare) è dovuta in parte alla bassa entropia interna di legame dovuta a sua volta alla rigidità dei composti.

L'evoluzione dell'Apixaban è un esempio delle intuizioni avute confrontando le strutture delle tasche S1 delle serina proteasi al fine di progettare inibitori fXa con maggiore selettività (figura 4.7) (Pinto *et al.*, 2010).

Dall'esame della scoperta degli inibitori di fIIa e fXa si può osservare che, in qualche caso, le strutture cristalline sono state usate per la spiegazione retrospettiva di un insolito rapporto struttura-attività (SAR). Spesso certe

informazioni sono state utilizzate in prospettiva nel *design* basato sulle strutture.

Non sorprende che gli inibitori dei fattori IIa e Xa mostrino sviluppi convergenti. Entrambi sono molecole a forma di “L”, con una struttura centrale con attacchi opportunamente posizionati, sui quali possono essere introdotti sostituenti che si orientano verso le tasche S1 e S4.

Gli *scaffold* stessi possono o meno attuare legami ad idrogeno con gruppi funzionali, a seconda che l’obiettivo sia quello di usarli solo per ragioni steriche oppure per stabilire interazioni simili a quelle del substrato con la catena β del recettore che riveste la tasca S1, o interazioni addizionali con le tasche S2 o S3 (Nar, 2012).

Capitolo 5

5.1. Effetti della sostituzione di gruppi P1 arginino-mimetici con arilalogeni

Sin dalle prime ricerche sugli inibitori del fIIa e fXa si pensava che una forte interazione dei gruppi P1 basici con Asp189 nella tasca specifica S1 di queste proteasi a serina tripsino-simili fosse indispensabile per ottenere potenti inibitori. Il primo indizio che gruppi neutri potessero legarsi con la tasca S1 venne da studi del gruppo Sandoz, pubblicati nel 1993: in inibitori a struttura di esteri di acidi boronici, che si legavano covalentemente, le porzioni basiche sono state sostituite da una catena laterale metossipropilica. Nel 1998, anche la Merck ha riportato lavori che contenevano risultati che si discostavano dal concetto della necessità della presenza del gruppo basico (Lumma *et al.*, 1998) (Tucker *et al.*, 1998). Ad un attento esame della rappresentazione del legame del ligando alla tasca S1 del fIIa, le SAR di uno *scaffold* dipeptidico dimostrano che, sebbene con la rimozione delle interazioni basiche dell'Asp189 si manifesti una riduzione di potenza di circa 1000 volte, la sostituzione con un anello aromatico cloro sostituito compensava quasi completamente questa perdita di attività.

Una caratteristica specifica sia del fIIa che del fXa (e di alcuni altri membri della famiglia) è uno spazio residuo della tasca S1, la quale è rivestita da residui di Tyr228, Ala190 e Val213. C'è una molecola strutturale di acqua che riempie questa tasca secondaria, è legata all'ossigeno carbonilico di Ile227 ed è situata 3,3 Å al di sopra di Tyr228 (figura 5.1).

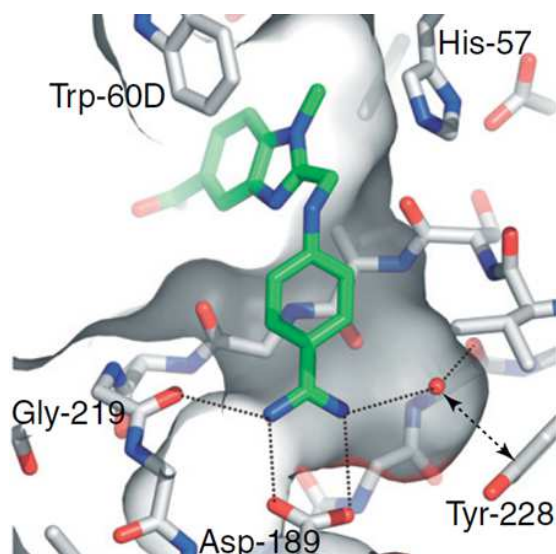


Figura 5.1: tasca S1 del fIIa nel complesso con il *Dabigatran*

Il cloro del composto della Merck spiazza questa molecola di acqua e forma un'interazione π *edge-on* con Tyr228 (figura 5.2).

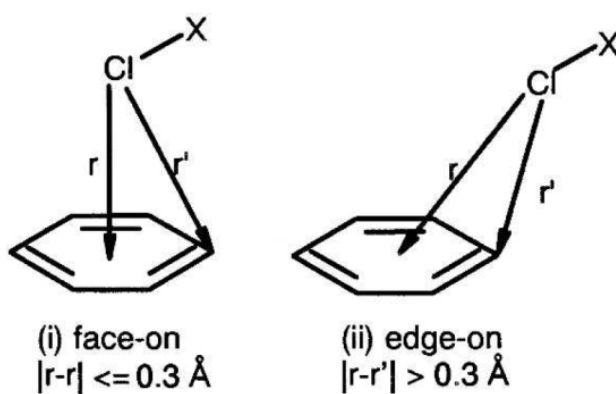


Figura 5.2: Da analisi geometriche delle interazioni alogeno- π nella struttura cristallina, sono state trovate due distinte strutture geometriche: la “*edge-on*” e la “*face-on*”. Nell’interazione *edge-on* l’attacco dell’alogeno avviene sugli atomi e sui legami dell’anello aromatico, mentre nell’interazione *face-on* l’attacco avviene nel centro dell’anello aromatico (Imai *et al.*, 2008)

Non viene instaurata nessuna interazione con Asp-189, che resta in una posizione per la maggior parte imperturbata rispetto allo stato *ligand-free* e allo stato legato con l'amidina.

Nel campo del fXa la stessa scoperta venne fatta in modo apparentemente indipendente. Nel 1998 una co-struttura del fXa con l'anticoagulante naturale *Tick Anticoagulant Peptide* (TAP) dimostrò che una catena laterale non carica, la Tyr1 nell'N-terminale del TAP, occupa la tasca S1.

Nel 2000, i ricercatori della Sanofi-Aventis documentarono che il loro tentativo di de-simmetrizzare gli inibitori bibasici contenenti il gruppo P4 con un clorobenzotiofene lipofilo portava a potenti inibitori che utilizzavano una modalità di legame invertita, cioè occupavano la tasca S1 del fXa con il gruppo lipofilo.

Contemporaneamente gruppi come Berlex, Lilly, Bayer e Merck trovarono composti con lo stesso farmacoforo come potenti inibitori del fXa in un lavoro di HTS.

Nel 2002 la Berlex pubblicò la co-struttura del fXa con rappresentanti della loro classe di amminofenoli, mostrando ancora una volta l'interazione chiave nella tasca S1. Infine, usando tripsina bovina per studiare il legame di un composto della Zeneca leggermente basico, identificato successivamente, Stubbs *et al.* (Stubbs *et al.*, 2002) scoprirono l'influenza del pH nella sua modalità di legame, con la modalità invertita che risultava essere quella prevalente a pH fisiologico.

Le informazioni di questi distinti tipi di interazione nella tasca S1 sono state utilizzate della Boehringer Ingelheim per convertire le molecole *lead* benzamidiniche ad alta attività in derivati di cloro benzamidazolo ugualmente potenti.

La scoperta del legame (Ar)C-Cl— π nel campo degli anticoagulanti ha aperto la strada per lo sviluppo dei farmaci che agiscono sul fXa.

La sorprendente scarsa riduzione dell'affinità rispetto agli inibitori benzammidici ha portato molti gruppi a studiare le interazioni in modo più dettagliato.

Venne osservato che l'introduzione di un atomo di idrogeno (H) al posto del cloro (Cl) riduceva la K_i da 70 a 200 volte. Usare il metile al posto del cloro risultava in una perdita da 6 a 19 volte, mentre il bromo aveva approssimativamente lo stesso effetto.

Lo spostamento di una molecola di acqua strutturale e la bassa energia di desolvatazione dei ligandi cloro arilici neutri sembrano avere una funzione. La geometria delle interazioni dei gruppi (Ar)C-Cl con l'anello fenolico di Tyr228 suggerisce che l'interazione attrattiva possa sorgere tramite un'interazione elettrostatica ottimizzata tra il " σ -hole" degli atomi di alogeni più pesanti cioè una distribuzione anisotropia della densità elettronica (con una superficie positiva di potenziale elettrostatico opposta al legame C-X) e la densità π sopra l'anello della Tyr.

Infine altri contatti nella tasca secondaria possono contribuire all'affinità di legame, specialmente per fIIa per cui è stato suggerito il contributo del legame dell'alogeno ai vicini carbonili della catena principale.

Effetti aggiuntivi, come ad esempio le interazioni lipofile con Val213, possono anche entrare in gioco quando viene considerata la possibilità di utilizzare gruppi metossilici, senza significativa perdita di affinità (ad esempio con *Apixaban*).

FIIa e fXa presentano nella sequenza un residuo Ala190, differenziandosi così dalla tripsina che presenta un residuo Ser190: ciò è favorevole ai fini della selettività per le proteasi.

Infatti, l'introduzione di un cloro o di un metile come sostituenti che raggiungono la tasca secondaria, crea inibitori per fXa con selettività 20000 volte maggiore rispetto alla tripsina.

5.2. Preferenza per legami con gruppi caricati positivamente nella tasca S4 del fXa

La natura idrofobica della tasca S4 del fXa fu descritta quando venne resa disponibile la struttura iniziale. La caratteristica importante della “scatola aromatica” costituita da Trp215, Phe174 e Tyr99 e il suo ruolo nel riconoscimento del ligando furono meglio apprezzate quando venne risolto il primo complesso strutturale con il ligando.

Il sistema degli anelli aromatici potrebbe essere stato progettato per colmare questa tasca e guadagnare affinità dalle ben note interazioni π arile-arile.

La disposizione rettangolare della catena laterale aromatica amminoacidica del recettore consentì l'utilizzazione delle interazioni sia π - π che *edge to face*.

La presenza di un punto focale posto sopra il centro della scatola aromatica che favorisce legami con frammenti cationici organici è stata osservata nel complesso strutturale del DX-9065a (figura 5.3).

Il composto recluta atomi di ossigeno carbonilico del Glu97 e della Lys96 e il carbossilato del Glu97 per le interazioni con la sua funzione acetimidoilica contenuta nel gruppo P4.

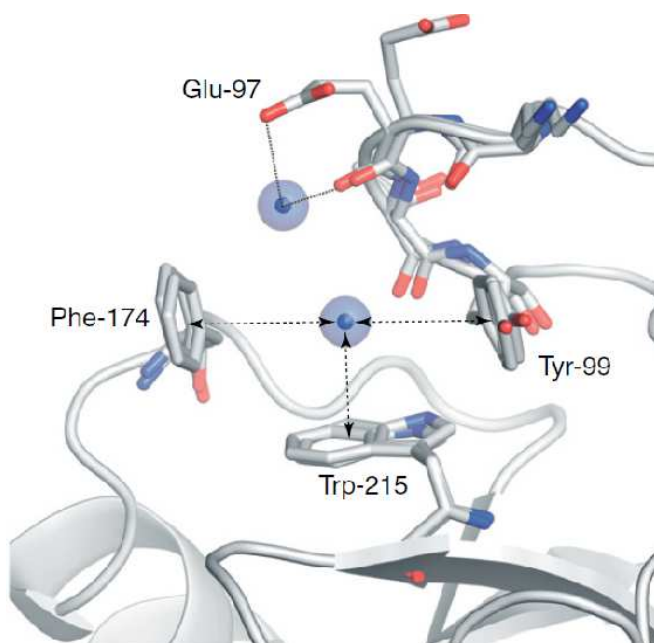


Figura 5.3 : la tasca S4 del fXa, illustrazione del punto focale posto sopra la “scatola aromarítica” (residui Phe174, Trp215 e Tyr99) che favorisce legami con frammenti cationici organici

Questa scoperta ha influenzato pesantemente la progettazione degli inibitori di fXa bibasici di prima generazione. Tuttavia prove strutturali del significato funzionale di questo punto focale sono rimaste vaghe e le SAR di gruppi basici P4 si sono rivelate alquanto superficiali.

Infatti in molti complessi di composti bibasici con fXa il gruppo basico P4 è posizionato al di fuori della tasca e interagisce indirettamente tramite una molecola di acqua, o non è chiaramente risolto oppure addirittura disordinato.

Un approccio più promettente per l'utilizzo dell'ambiente elettrostatico della scatola aromatica è l'uso di interazioni di gruppi aromatici con funzioni alifatiche C-H polarizzate e più acidificate. Un esempio è il *Rivaroxaban*, nel quale l'introduzione di un gruppo carbonilico sulla parte morfolinica aumenta l'affinità di un fattore 60, in parte a causa del suo effetto sulla polarizzazione del gruppo metilenico vicino a Tyr215. Questo principio è alla base delle

interazioni catione- π frequentemente osservate nella tasca S4 del fXa (figura 5.4).

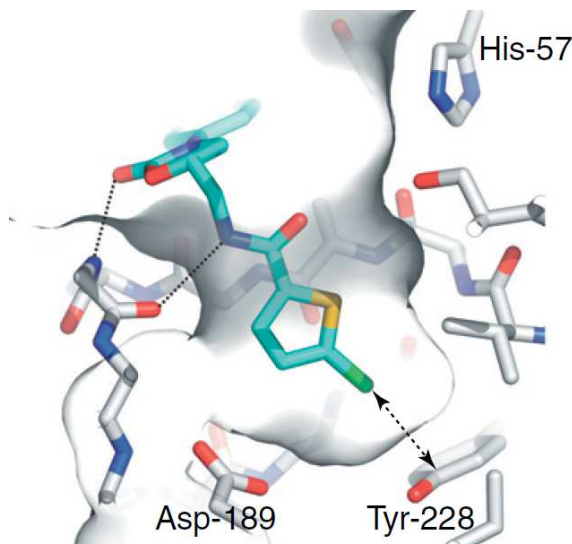


Figura 5.4 : tasca S1 del fXa nel complesso con il *Rivaroxaban*

La polarizzazione del legame C-H è alta quando vi sono atomi di azoto vicini con una carica formale positiva. Studi del gruppo Diederich hanno dimostrato che l'introduzione sequenziale di gruppi metilici su un'ammina alifatica aumenta l'affinità per fXa e l'ammonio quaternario può interagire con la catena laterale di tutti e tre gli amminoacidi aromatici (Nar, 2012).

Il punto focale per questi atomi di azoto quaternari è localizzato nel centro geometrico della scatola aromatica ed è localizzato circa 3 Å più in basso del foro cationico del punto focale. L'identificazione del foro cationico e del punto focale catione- π è stato usato nella progettazione degli inibitori fXa in un gran numero di casi che riguarda eterocicli aromatici e alifatici con funzionalità basiche.

5.3. Progettazione structure-based degli inibitori “duali” di fIIa e fXa

Strategie anticoagulanti in animali ematofagi coinvolgono frequentemente più inibitori della coagulazione e l'attivazione piastrinica. Combinazioni di inibitori di fIIa e fXa a basse dosi in modelli animali di trombosi hanno dimostrato che l'inibizione simultanea di entrambi i bersagli produce un effetto sinergico antitrombotico. Una combinazione dell'attività inibitoria di FIIa e FXa in un unico composto, biodisponibile per via orale e a basso peso molecolare è un nuovo approccio alla terapia antitrombotica ed è considerata promettente per anticoagulanti con funzionalità potenzialmente superiori rispetto agli inibitori specifici.

La base strutturale di questo concetto è che, malgrado le significative differenze nella topologia dei siti attivi di fIIa e fXa, l'impronta chimica quasi identica delle tasche S1 e la comune natura idrofoba delle tasche S2 e S4 dovrebbero portare alla generazione di inibitori duali.

La Boehringer Ingelheim è stata la prima a pubblicare studi su questi composti, i quali sono derivati di benzamidine correlate al Dabigatran.

Sebbene le 4-(1-metil-benzamidazol-2-il)metilaminobenzamidine utilizzino un distinto metodo di legame, le interazioni principali della porzione metil benzimidazolica nella tasca S2 e la loro porzione pirrolidincarbossamidica nella S4 sono identiche.

Il potente inibitore duale *Tanogitran* è stato sviluppato da questa serie (figura 5.5).

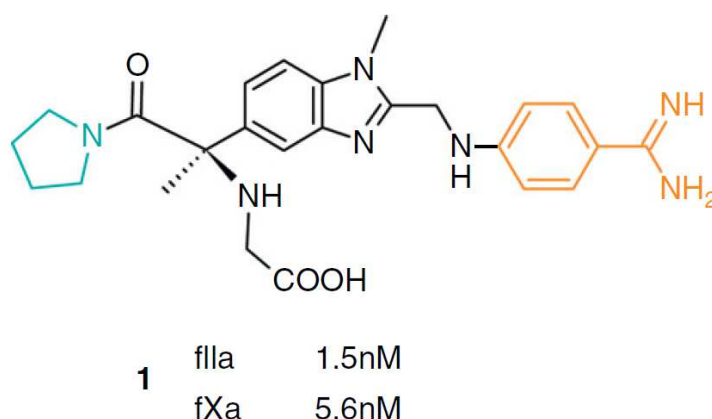


Figura 5.5: struttura del *Tanogitran*, porzione che lega con la tasca S1 (arancione) e porzione che lega con la tasca S4 (blu)

Anche altri gruppi hanno pubblicato inibitori duali non basici con diverse strutture.

Il gruppo Merck stava lavorando all'ottimizzazione *structure-based* della classe *lead* derivata da HTS di ossazolopiridine non basiche, quando studi di SAR sui sostituenti P4 hanno inaspettatamente portato a composti con potenza significativa verso fXa (figura 5.6).

L'analisi retrospettiva della struttura a raggi X ha dimostrato che gli inibitori usano una conformazione di legame simile nel complesso con il target.

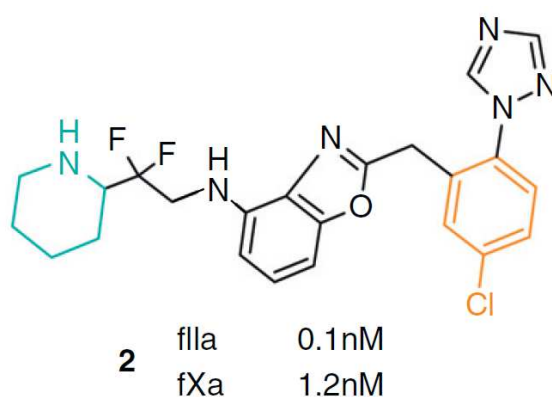


Figura 5.6: struttura dell'inibitore duale del gruppo Merck, porzione che lega con la tasca S1 (arancione) e porzione che lega con la tasca S4 (blu)

Il team della GlaxoSmithKline (GSK), trovò casualmente relazioni struttura-selettività nel clorotienilamminopirrolidone nella *lead-class* del fXa.

Saturando il legame dell'alchene *linker* tra il gruppo P1 clorometilico e il pirrolidinone, avviene inversione di selettività con un aumento di potenza per il fIIa, mentre la sostituzione del gruppo etilenico con un metile produce un potente inibitore duale di entrambi gli enzimi (figura 5.7).

In questo caso la co-struttura a raggi X mostra modalità di legame all'inibitore molto diverse. La funzione morfolinica terminale occupa S4 nel fattore fXa e S2 in fIIa.

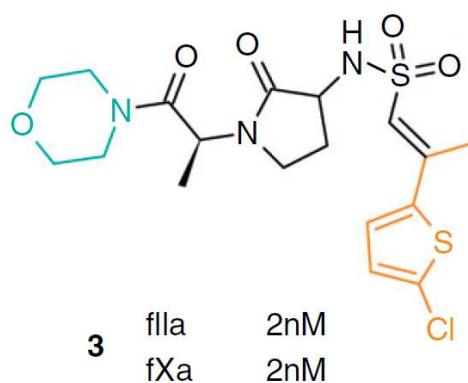


Figura 5.7: struttura dell'inibitore duale del team GSK, porzione che lega con la tasca S1 (arancione) e porzione che lega con la tasca S4 (blu)

Quindi, l'identificazione di inibitori duali si è verificata principalmente in modo casuale ed è stata razionalizzata retrospettivamente da informazioni strutturali. E' interessante notare che tutti gli inibitori duali sviluppati hanno in comune un sostituito alifatico P4 che ovviamente è il miglior compromesso di legame farmacoforico alla tasca S4, per ottenere specificità duale. Il composto risultante mostra la più favorevole attività anticoagulante in vitro (Nar, 2012).

Conclusioni

I disordini tromboembolici sono la maggior causa di mortalità e di stati patologici nelle società occidentali. Strettamente legata alle patologie tromboemboliche è l'eccessiva stimolazione della cascata coagulativa. L'attivazione della cascata coagulativa comporta due fasi cruciali che insieme costituiscono il comune percorso coagulativo e sono la formazione di trombina tramite il complesso protrombinico, formato dal fVa, fXa e dai fosfolipidi, e la scissione proteolitica del fibrinogeno ad opera della trombina, generando la matrice insolubile del coagulo che è formata da fibrina. La trombina, inoltre, induce attivazione piastrinica e innesca una serie di effetti secondari della trombosi (Hauel *et al.*, 2002).

Storicamente la terapia antitrombotica è stata basata sugli antagonisti della vitamina K (es. warfarin) o inibitori indiretti della trombina come le LMWH (es. enoxaparin). Nonostante la loro alta efficacia clinica nel ridurre trombosi venose profonde ed embolie polmonari, queste terapie hanno delle limitazioni (Hegde e Schmidt, 2009).

Una svolta terapeutica è avvenuta con la scoperta degli inibitori del fIIa e del fXa.

Questi inibitori sono stati identificati dalla progettazione basata su analoghi del substrato, progettazione *de novo*, *structure-based screening*, HTS seguito dalla progettazione guidata della struttura, trasferimento delle SAR, innesti di frammenti. L'operare contemporaneamente su molti parametri condusse al successo degli inibitori fIIa e fXa che hanno raggiunto valori subnanomolari di attività nei saggi enzimatici, alta selettività contro altre proteasi tripsinomiali, efficacia *in vitro* e *in vivo* nei saggi di coagulazione plasmatica e in

modelli animali di trombosi, biodisponibilità orale e lunga durata d'azione che consente somministrazioni giornaliere uniche. Tutti questi elementi richiedevano conoscenze chimiche su cui avviare o focalizzare l'ottimizzazione e buone idee sulle proprietà chimico-fisiche da perseguire.

Il *property design* in molti casi si è basato sulla buona pratica della chimica farmaceutica, ma è stato fortemente influenzato da informazioni strutturali, attraverso la dimostrazione di quale elemento chiave dei composti *lead* fosse da mantenere e quale parte della molecola fosse da esplorare per questo scopo.

La scoperta di inibitori di fIIa è apparentemente più difficile perché un'efficace inibizione di questa proteina richiede livelli elevati di inibitore libero nel plasma sanguigno in corrispondenza dell'aumento di fIIa nella fase iniziale della coagulazione. Questi requisiti sono meno rigorosi per fXa che è presente nel plasma in concentrazioni approssimativamente 10 volte inferiori. Approcci progettuali peptidomimetici hanno ricevuto relativamente poca attenzione nella scoperta di farmaci durante gli ultimi 10 anni, a causa delle grandi difficoltà incontrate nell'ottenimento di composti biodisponibili per via orale con buona farmacocinetica partendo dai peptidi. La scoperta del *Dabigatran* è uno dei pochi esempi di successo dei programmi peptidomimetici. Essa rappresenta un incoraggiante caso di studio per la scoperta di nuovi farmaci che si occupino di bersagli difficili come interazioni proteina-proteina.

Apparentemente, il *Dabigatran*, molto polare, combina potenza, bassi livelli di legame con proteine plasmatiche ed emivita opportunamente lunga, in modo migliore rispetto ad ogni altro inibitore fIIa debolmente polare o perfino neutro (Nar, 2012).

Il profarmaco *Dabigatran etexilato* neutro a sua volta possiede proprietà chimico fisiche che assicurano biodisponibilità orale e per questi motivi ha ottenuto l'autorizzazione all'immissione in commercio nel 2008, con il nome commerciale Pradaxa®; ne seguirono anche l'immissione degli inibitori del fXa *Rivaroxaban*, nello stesso anno, con il nome di Xarelto® e dell'*Apixaban*, nel 2011, con il nome di Eliquis®.

A differenza del warfarin, il Dabigatran etexilato può essere somministrato a dose fissa con rapida insorgenza d'azione. Fornisce un prevedibile e consistente effetto anticoagulante senza bisogno di monitoraggi.

Dabigatran è un potente inibitore della trombina ($K_i = 4.5 \text{ nM}$); picchi di concentrazione plasmatica del Dabigatran appaiono a 0.5-2 h dopo la somministrazione in volontari sani e 7-9 h in pazienti subito dopo operazioni ortopediche, riducendosi a 2 h nei giorni seguenti. L'emivita è di 11 h in soggetti sani e 14-17 h negli anziani. Il Dabigatran ha un alto volume di distribuzione e un basso legame con le proteine plasmatiche (35%).

I risultati degli studi dimostrarono che il Dabigatran etexilato (dosi di 220 mg oppure di 150 mg al giorno) dimostrava un'efficacia equivalente a quella dell'enoxaparina (dose di 40 mg al giorno) nella prevenzione della formazione di coaguli di sangue senza significative differenze nei tassi di sanguinamento. Pazienti con moderati danneggiamenti renali (GFR, *Glomerular Filtration Rate* tra 30 e 50 mL) necessitano di dosi minori di Dabigatran perché hanno un aumentato rischio emorragico. E' sconsigliato l'uso per pazienti con GFR < 30 mL/minuto e in pazienti con enzimi epatici due volte più alti rispetto al limite massimo normale (ULN, *Upper Limit of Normal*).

Tra gli effetti collaterali il più significativo è indubbiamente il sanguinamento inoltre non deve essere usato anche nei pazienti che assumono chinidina (Hegde e Schmidt, 2009).

Dalla storia della scoperta degli inibitori del fIIa e del fXa si può imparare che osservazioni di nuovi tipi di interazione proteina-ligando in questo campo hanno spinto l'attività della ricerca di base, che ha portato ad una migliore comprensione dei principi fisici. La parte più rilevante, come detto sopra, sono le interazioni catione— π o arilalogeno— π che sono ora ben comprese e comunemente usate nella progettazione basata sulla struttura (Nar, 2012).

Bibliografia

- ✓ Becattini, M. C. Vedovati, G. Agnelli, “Old and new oral anticoagulants for venous thromboembolism and atril fibrillation: a review of the literature”. *Thrombosis Research* (2012), 129: 392-400.
- ✓ C. A. Van Huis, A. Casimiro-Garcia, C. F. Bigge, W. L. Cody, D. A. Dudley, K. J. Filipski, R. J. Heemstra, J. T. Kohrt, R. J. Leadley Jr., L. S. Narasimhan, T. McClanahan, I. Mochalkin, M. I. Pamment, J. T. Peterson, V. Sahasrabudhe, R. P. Schaum, J. J. Edmunds, “Exploration of 4,4-disubstituted pyrrolidine-1,2-dicarboxamides as potent, orally active Factor Xa inhibitors with extended duration of action”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2009), 17: 2501–2511.
- ✓ C. Guyton., J. E. Hall, Capitolo 36 “Emostasi e coagulazione”: 455-466, *Fisiologia medica* (2006), XII edizione, MASSON.
- ✓ D. J. P. Pinto, J. M. Smallheer, D. L. Cheney, R. M. Knabb, R. R. Wexler, “Factor Xa Inhibitors: Next-Generation Antithrombotic Agents”. *Journal of Medicinal Chemistry* (2010), 53: 6243-6274.
- ✓ D. J. P. Pinto, M. J. Orwat, S. Koch, K. A. Rossi, R. S. Alexander, A. Smallwood, P. C. Wong, A. R. Rendina, J. M. Luetngen, R. M. Knabb, K. He, B. Xin, R. R. Wexler, P. Y. S. Lam, “Discovery of 1-(4-Methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (Apixaban, BMS-562247), a Highly Potent, Selective, Efficacious, and Orally

- Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa". *Journal of Medicinal Chemistry* (2007), 50: 5339-5956.
- ✓ D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt , Capitolo 11, "Le serina proteasi": 351-365, *Fondamenti di biochimica* (2001), ZANICHELLI.
 - ✓ G. Castoldi, V. Liso, Capitolo 17 "Fisiopatologia dell'emostasi e della coagulazione": 509-536, *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici* (2007), V edizione, McGRAW-HILL.
 - ✓ H. Nar, "The role of structural information in the discovery of direct thrombin and factor Xa inhibitors". *Trends in pharmacological sciences – Cell*, (2012), 1-10.
 - ✓ H. Zhao, Z. Guo, "Medicinal chemistry strategies in follow-on drug discovery". *Drug Discovery Today* (2009), 14: 516-522.
 - ✓ J. A. Huntington, "Thrombin plasticity". *Biochimica et Biophysica Acta* (2012): 246-252.
 - ✓ J. Harenberg, S. Marx, M. Krejczy, M. Wehling, "New anticoagulants-promising and failed developments". *British Journal of Pharmacology* (2012), 165: 363-372.
 - ✓ J. J. Perona, C. S. Craik, "Structural basis of substrate specificity in the serine proteases". *Protein Science* (1995), 4: 337-360;
 - ✓ J. Kraut, J.D. Robertus, R.A. Alden, J.J. Birktoft, "Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization". *Biochemistry*(1972), 23: 4293-4303.

-
- ✓ L. Schechter, A. Berger, “On the size of the active site in proteases. I. Papain”. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, (1967), 27: 157–162.
 - ✓ M. A. Krupiczko, C. J. Scotton, R. C. Chambers, “Coagulation signalling following tissue injury: Focus on the role of factor Xa”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2008), 40: 1228-1237.
 - ✓ M. Murcia, A. Morreale, A. R. Ortiz, “Comparative binding analysis considering multiple receptors: a step toward 3D-QSAR models for multiple targets”. *Journal of Medicinal Chemistry* (2006), 49: 6241-6253.
 - ✓ M. Renatus, W. Bode, R. Huber, J. Stürzebecher, M. T. Stubbs, “Structural and Functional Analyses of Benzamidine-Based Inhibitors in Complex with Trypsin: Implications for the Inhibition of Factor Xa, tPA, and Urokinase”. *Journal of Medicinal Chemistry* (1998), 41:5445-5456.
 - ✓ M.T. Stubbs, S. Reyda, F. Dullweber, M. Möller, G. Klebe, D. Dorsch, WWKR Mederski, H Wurziger, “pH-dependent binding modes observed in trypsin crystals: lessons for structure-based drug design”. *ChemBioChem* (2002), 3: 246–249.
 - ✓ N. H. Havel, H. Nar, H. Priepke, U. Ries, J. Stassen, W. Wienen, “Structure-Based Design of Novel Potent Nonpeptide Thrombin Inhibitors”. *Journal of Medicinal Chemistry* (2002), 45: 1757-1766;

-
- ✓ N. Haginoya, S. Kobayashi, S. Komoriya, T. Yoshino, M. Suzuki, T. Shimada, K. Watanabe, Y. Hirokawa, T. Furugori, T. Nagahara, "Synthesis and Conformational Analysis of a Non-Amidine Factor Xa Inhibitor That Incorporates 5-Methyl-4,5,6,7-tetrahydrothiazolo[5,4-c]pyridine as S4 Binding Element". *Journal of Medicinal Chemistry* (2004), 47: 5167-5182.
 - ✓ R. J. Young, "The successful quest for oral factor Xa inhibitors; learnings for all of medicinal chemistry?". *Bioorganic & Medicinal Letters* (2011), 21: 6228-6235;
 - ✓ S. Hegde, M. Schmidt, "Chapter 28 - To Market, To Market - 2008". *Annual Reports of in Medicinal Chemistry*, (2009), 44: 577-632.
 - ✓ S. Michaelis, A. Marais, A. K. Schrey, O. Y. Graebner, C. Schaudt, M. Sefkow, F. Kroll, M. Dreger, M. Glinski, H. Koester, R. Metternich, J. J. Fischer, "Dabigatran and Dabigatran Ethyl Ester: Potent Inhibitors of Ribosyldihydronicotinamide Dehydrogenase (NQO2)". *Journal of Medicinal Chemistry* (2012), 55: 3934-3944.
 - ✓ S. Roehrig, A. Straub, J. Pohlmann, T. Lampe, J. Pernerstorfer, K. Schlemmer, P. Reinemer, E. Perzborn, "Discovery of the Novel Antithrombotic Agent 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): An Oral, Direct Factor Xa Inhibitor". *Journal of Medicinal Chemistry* (2005), 48: 5900-5908.
 - ✓ T. J. Tucker, S. F. Brady, W. C. Lumma, S. D. Lewis, S. J. Gardell, A. M. Naylor-Olsen, Y. Yan, J. T. Sisko, K. J. Stauffer, B. J. Lucas, J. J.

- Lynch, J. J. Cook, M. T. Stranieri, M. A. Holahan, E. A. Lyle, E. P. Baskackin, I. Chen, K. B. Dancheck, J. A. Krueger, C. M. Cooper, J. P. Vacca, "Design and Synthesis of a Series of Potent and Orally Bioavailable Noncovalent Thrombin Inhibitors That Utilize Nonbasic Groups in the P1 Position". *Journal of Medicinal Chemistry* (1998), 41: 3210-3219
- ✓ T. L. Lemke, D. A. Williams, Capitolo 31 "Antitrombotici, trombolitici, coagulanti e sostituti empoplastici": 901-933, Foye's principi di chimica farmaceutica (2010), V edizione, PICCIN.
- ✓ W. Bode, D. Turk, J. Stürzebecher, "Geometry of binding of the benzamidine- and arginine-based inhibitors N alpha-(2-naphthylsulphonyl-glycyl)-DL-p-amidinophenylalanyl-piperidine (NAPAP) and (2R,4R)-4-methyl-1-[N alpha-(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinolinesulphonyl)-L-arginyl]-2-piperidine carboxylic acid (MQPA) to human alpha-thrombin. X-ray crystallographic determination of the NAPAP-trypsin complex and modeling of NAPAP-thrombin and MQPA-thrombin". *European Journal Biochemistry*, (1990), 193: 175-182.
- ✓ W. C. Lumma, Jr., K. M. Witherup, T. J. Tucker, S. F. Brady, J. T. Sisko, A. M. Naylor-Olsen, S. D. Lewis, B. J. Lucas, J. P. Vacca, "Design of Novel, Potent, Noncovalent Inhibitors of Thrombin with Nonbasic P-1 Substructures: Rapid Structure-Activity Studies by Solid-Phase Synthesis". *Journal of Medicinal Chemistry* (1998), 41: 1011-1013.

- ✓ Y. N. Imai, Y. Inoue, I. Nakanish, K. Kitaura, “Cl- π interactions in protein–ligand complexes”. *Protein Science* (2008), 17: 1129-1137.

